UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Année 1948 — Série U - N° 133

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 21 Mai 1948

PAR

MARCEL PLUMEL

Ancien interne des Hôpitaux de Paris
Lauréat de la Faculté de Pharmacie
Titulaire du Certificat d'Études Supérieures de Chimie Biologique appliquée
de la Faculté de Pharmacie de Paris

RECHERCHES

SUR LES

PHOSPHATASES ACIDES ANIMALES

JURY :

Président : P. FLEURY
Examinateurs : G. VALETTE
» J. COURTOIS

CENTRE DE DOCUMENTATION UNIVERSITAIRE
TOURNIER & CONSTANS
5, Place de la Sorbonne, 5
PARIS-Ve
1948

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION :

MM. René FABRE, *Doyen*, O. ✻, ✪ I.
Marcel SOMMELET, *Assesseur*, ✻, ✪ I.
H.-J. LIONNET, *Secrétaire*, ✻, ✪ I.
L. JEANDEL, *Rédacteur*, ✪ A.

PROFESSEURS :

MM.	SOMMELET, ✻, ✪ I.	Chimie organique.
	FABRE, O. ✻, ✪ I.	Toxicologie.
	PICON, ✻, ✪ I.	Chimie minérale.
	DELABY, ✻, ✪ I.	Pharmacie chimique.
	MASCRE, ✻, ✪ I.	Botanique.
	SARTORY, C. ✻, ✪ I.	Microbiologie.
	FLEURY, ✻, ✪ I.	Chimie biologique.
	JANOT, ✪ I.	Pharmacie galénique.
	CHARONNAT, ✪ I.	Chimie analytique.
	VALETTE, ✪ I.	Zoologie appliquée.
	BEDEL, ✻, ✪ I.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie.
	PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
	GUILLOT	Physique.
	RAOUL	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✻, ✪ I.

Professeurs honoraires :

MM. DELEPINE, O. ✻, ✪ I. et LEBEAU, O. ✻, ✪ I., Membres de l'Institut. PERROT, C. ✻, ✪ I., COUTIERE, O. ✻, ✪ I., BOUGAULT, O. ✻, ✪ I., LUTZ, ✻, ✪ I., GORIS, O. ✻, ✪ I., HERISSEY, O. ✻, ✪ I., LAUNOY, O. ✻, ✪ I.

MAITRES DE CONFERENCES :

MM.	GAUTIER, ✪ I.	Sciences physiques et chimiques.
	DOMANGE, ✪ I.	Sciences physiques et chimiques.
	CRETE	Sciences naturelles.
	COURTOIS	Sciences physiques et chimiques.
	MORETTE	Sciences physiques et chimiques.
Mlle	LAMBIN, ✪ I.	Sciences naturelles.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES :

MM.	CORRIEZ, ✪ I.	Physique.
	HARISPE, travaux pratiques de 1re année	Chimie générale et pharmaceutique.
	CAVIER	Biologie animale.
	TRUHAUT, ✻, ✪ A., travaux pratiques de 4e année	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.
	MOREAU	Chimie analytique.
	N.	Botanique.
	GERMAN (F.F.)	Microbiologie.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, ✪ I.
Bibliothécaire : Mlle LAVAUD, ✪ A.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A Monsieur le PROFESSEUR P. FLEURY,

Professeur à la Faculté de Pharmacie,
Pharmacien Chef des Hôpitaux Psychiâtriques
de la Seine,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

qui a toujours témoigné d'une grande bienveillance à notre égard et nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre Jury de Thèse.

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le PROFESSEUR G. VALETTE,

Professeur à la Faculté de Pharmacie,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris.

qui a bien voulu examiner notre travail.

Respectueux Hommage.

A Monsieur Jean COURTOIS,

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie,
Pharmacien des Hôpitaux de Paris.

qui nous a constamment guidé dans nos recherches.

En témoignage de profonde gratitude.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550019_0035

A MES PARENTS

A MA FEMME.

A MES ENFANTS.

- MEIS et AMICIS -

A Monsieur P. AUTRIVE,

Pharmacien,
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

qui fut notre premier Maître
en pharmacie.

Cordial Hommage.

A Monsieur P. BRUNEAU,

Membre associé de l'Académie de Pharmacie,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

Monsieur R. BERNIER,

Docteur en Pharmacie,
Membre de l'Académie de Pharmacie.

qui nous ont constamment encouragé
au cours de nos recherches et qui
sont pour nous un constant exemple
de droiture et d'énergie.

Monsieur M. LAUDAT,

Membre de l'Académie de Pharmacie.
Docteur en Pharmacie

qui nous a inculqué le goût de la
précision analytique et s'est in-
téréssé à nos recherches.

En témoignage de profonde reconnaissance.

INTRODUCTION

Les phosphomonoestérases sont classées depuis les travaux de FOLLEY et KAY (40) selon leur pH optimum d'activité; les unes sont actives en milieu alcalin, comme la phosphatase AI du sérum; d'autres en milieu acide, comme les phosphatases A_2, A_3 du sérum ou A_4 des hématies.

Parmi ces dernières, la phosphatase A2 du sérum a fait l'objet de nombreux travaux depuis quelques années et la mesure de son activité rend de précieux services dans le diagnostic du cancer de la prostate.

Contrairement au sérum, l'urine renferme principalement de la phosphatase A_2 et cet enzyme y a été jusqu'ici peu étudié.

COURTOIS et BIGET (27), BIGET (IO), n'ont jamais pu identifier de phosphatase AI d'activité appréciable dans l'urine, même dans la maladie de Paget, qui s'accompagne d'une hyperphosphatasémie A_I considérable.

L'urine de Femme renferme une phosphatase A2 qui possède de nombreuses analogies avec celle du sérum. Chez l'Homme, l'activité est plus élevée que chez la Femme, WOLBERGS (IOI) COURTOIS et BIGET (27); il vient en effet s'y ajouter l'excrétion d'enzyme prostatique. Il parait logique d'envisager une origine sérique à la phosphatase urinaire normale; celle qui se trouve dans l'urine prélevée par cytostomie, dans les urines de la Femme, des sujets prostatectomisés et enfin mélangée à l'enzyme d'origine prostatique chez l'Homme.

Ces diverses préparations ont qualitativement les mêmes caractères, pH optimum vers 5,2; activité insignifiante en milieu alcalin, même en présence d'ions Mg^{++}, hydrolyse plus rapide du β glycérophosphate que de son isomère α; inhibition concurrente par le fluorure de sodium.

Nous avons été amenés à envisager que la majeure partie de la phosphatase urinaire pourrait résulter de la diffusion au niveau du rein de l'enzyme du sérum.

En vue de préciser cette conception, nous nous sommes proposés d'étudier dans ce travail la phosphatase acide II et de rechercher les rapports pouvant exister entre son activité dans le sérum et dans l'urine chez les sujets normaux et dans diverses affections pathologiques avec l'espoir de pouvoir saisir son mode d'élimination et de mettre en évidence l'existence d'un seuil d'élimination rénale.

Nous avons recherché sa répartition dans le sérum et l'urine des différents groupes animaux, afin de saisir l'influence possible de l'espèce ou du régime alimentaire.

Nous avons entrepris dans les chapitres suivants d'étudier la purification de l'enzyme urinaire et ses caractéristiques de précipitation par différentes techniques. Enfin, nous nous sommes appliqués à étudier son champ d'action sur les différents substrats afin de la comparer à la phosphatase acide du sérum et aux diverses préparations de phosphatase II, d'origine animale ou végétale déjà connues.

L'étude de l'hydrolyse des différents substrats nous a amené à mettre en évidence dans le sérum la présence d'enzymes hydrolysant les diesters de l'acide phosphorique. Nous avons étudié cette propriété d'une façon précise en pratiquant les dosages du Phénol et de l'acide phosphorique libérés par l'hydrolyse du diphénylphosphate, ce qui nous a permis de montrer la présence de trois diestérases dans le sérum.

Nous exprimons notre respectueuse gratitude à M. le Professeur FLEURY qui nous a fait l'honneur de nous inscrire au nombre de ses élèves, pour l'intérêt qu'il n'a cessé de porter à nos recherches.

Nous adressons également nos remerciements à Mr. Le Professeur VALETTE qui a accepté d'examiner notre travail et de faire partie de notre Jury de Thèse.

Ce travail a été commencé pendant notre internat à l'Hôpital DUBOIS où notre Maître J. COURTOIS nous a réservé un accueil bienveillant dans son laboratoire. Il nous a fourni le sujet de ces recherches et nous a fait profiter de sa grande expérience dans le domaine de l'enzymologie; par la suite, il n'a jamais cessé de nous prodiguer ses conseils pour l'exécution de ce travail; nous le prions de trouver ici l'expression de nos sentiments de respectueuse reconnaissance et de croire à notre profond attachement.

Nous avons poursuivi ce travail pendant l'occupation et depuis la fin de la guerre dans un des services de recherches des Laboratoires BRUNEAU et Cie, où rien n'a été négligé afin de nous en faciliter l'exécution; que MM. P. BRUNEAU et R. BERNIER nous permettent de leur exprimer ici notre profonde reconnaissance.

PLAN DU TRAVAIL

INTRODUCTION.

PREMIERE PARTIE :

ETUDE COMPAREE DES PHOSPHOMONOESTERASES A1 et A2 DU SERUM ET DE L'URINE.

Chapitre I : Généralités sur les phosphatases animales du sang et de l'urine.

Chapitre II : Etude comparée de l'activité phosphatasique du sérum et de l'urine, chez l'Homme normal et au cours de diverses affections pathologiques.

Chapitre III : Activités phosphatasiques du sérum, de l'urine et de la prostate chez diverses espèces animales.

DEUXIEME PARTIE :

ESSAIS DE PURIFICATION DE LA PHOSPHATASE URINAIRE.

Chapitre I : Essais de purification
1°) par entrainement par les mousses.
2°) par relargage à l'aide du sulfate d'ammonium.

Chapitre II : Précipitation de la phosphatase urinaire par l'alcool.

Chapitre III : Précipitation de la phosphatase urinaire par l'acétone.

Chapitre IV : Essais de concentration par adsorption.

TROISIEME PARTIE :

ETUDE DU CHAMP D'ACTION ET DE LA SPECIFICITE DE LA PHOSPHATASE URINAIRE.

Chapitre I : Préparation des substrats.

Chapitre II : Etude du Champ d'action de la phosphatase urinaire.

Chapitre III : Etude comparative de l'activité phosphatasique II du sérum et de l'urine sur divers substrats.

QUATRIEME PARTIE :

ETUDE DES PHOSPHODIESTERASES DU SERUM.

Chapitre I : Action des phosphatases sur le diphényl-orthophosphate.

Chapitre II : Dosage colorimétrique du Phénol.

Chapitre III : Etude du système tampon cacodylate de sodium-ClH.

Chapitre IV : Etude de l'activité des phosphodiestérases du sérum, en fonction du pH.

CONCLUSIONS.

BIBLIOGRAPHIE.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES PHOSPHATASES ANIMALES DU SANG ET DE L'URINE.

Les tissus des mammifères renferment des phosphatases isodynames (a). ROCHE et COURTOIS (84). Ces diastases possèdent sensiblement la même spcificité et hydrolysent différents types d'esters phosphoriques.

L'acide orthophosphorique possédant trois fonctions acides peut former, avec les substances alcooliques ou phénoliques, trois catégories d'esters dont de très nombreux représentants ont été préparés par voie synthétique. L'hydrolyse diastasique de ces corps est en rapport avec leur répartition; à notre connaissance il n'a été séparé des tissus vivants que de nombreux monoesters et quelques diesters; or, il n'a jamais été signalé d'enzyme actif sur les triesters; un certain nombre de préparations diastasiques attaquent les diesters et les préparations actives sur les monoesters sont extrêmement nombreuses.

Il apparait donc que l'on peut distinguer deux catégories d'enzymes : d'une part les phosphomonoestérases hydrolysant les monoesters et d'autre part, les phosphodiestérases agissant sur les diesters. ROCHE et LATREILLE (85); nous apportons d'ailleurs dans ce travail des arguments en faveur de l'existence de ces deux groupes d'enzymes.

Les monoestérases ont été subdivisées en quatre principaux groupes et on a retrouvé dans le sang ces quatre types de phosphomonoestérases isodynames.

I°) La phosphatase alcaline I de pH optimum voisin de 9,0 est activée par l'ion

(a): On nomme "enzymes isodynames" des enzymes ayant des caractères différents, mais présentant la même spécificité.

magnésium et insensible à l'action des fluorures.

Cet enzyme est très répandu dans les organismes animaux et rares sont les organes qui n'en renferment pas. Toutefois, elle est particulièrement abondante dans les os des animaux en voie de croissance, WOODARD (103), le rein d'où elle a pu être extraite à l'état cristallisé, NGUYEN VAN THOAI, ROCHE et SARTORI (73), le placenta, WISLOCKI, DEANE et DEMPSEY (100), la glande mammaire en lactation, les globules blancs, la muqueuse intestinale. Elle est présente à un degré moindre dans le foie, le sérum, les hématies, le cerveau, les levures et dans certaines bactéries (B.Coli, B.Alcaligenes foecalis, Clostridium acétobutylicum (77); elle n'existe ni chez les végétaux chlorophylliens, ni chez les champignons supérieurs. ROCHE et COURTOIS (84).

Elle se rencontre dans les hématies et le sérum. C'est la phosphatase de beaucoup la plus active du sérum; KAY (58) a montré que son activité augmente beaucoup dans diverses maladies osseuses : ostéite déformante de PAGET. BODANSKY et JAFFE (13), PAUTRAT (75), GUILLAUMIN (45), DUVOIR, LAYANI et PAUTRAT (34).
ostéite fibrokystique de RECKLINGHAUSEN. CORYN (25), A. et E. GUTMAN (50), PAUTRAT (75),
métastases osseuses du cancer généralisé. CORYN (25), CRISTOL et CAYLA (29), SIMMONS et FRANZEEN (94),
syphilis osseuse. CORYN (25), CRISTOL et CAYLA(29)
rachitisme. BARNES et MUNKS (8), RAOUL et VINET (80), SMITH et MAIZELS (95).

Des variations d'activité moins importantes et moins constantes ont été signalées dans de nombreuses maladies osseuses; en général, on observe une augmentation d'activité dans les maladies avec ostéogenèse, ce qui a permis d'attribuer comme origine à cette phosphatase les cellules ostéogéniques. WOODARD (103).

C'est un fait bien établi que le taux de phosphatase I est plus élevé chez les sujets en voie de croissance que chez les adultes.SMITH et MAIZELS (95), BODANSKY (12), ROSAHN (89), ALLCROFT et FOLLEY (1).

La voie normale d'excrétion de cette phosphatase semble être exclusivement la bile, ce qui permet d'expliquer l'augmentation d'activité lors des ictères par obstruction, SANDORMAN (9I), le rein intact paraissant totalement imperméable à cet enzyme. Des augmentations importantes d'activité ont été signalées par ROBERTS (8I) (82) dans les ictères par rétention (calcul), cancer des voies biliaires, FIESSINGER et BOYER (35), MALLET-GUY et EXCOFFIER (66)(67), GUILLAUMIN (45), alors que l'on n'observe pas habituellement d'augmentations importantes dans les ictères infectieux et l'ictère hémolytique.

Des augmentations assez élevées ont été signalées dans divers types de cancers non osseux, hépatomes primaires et transplantés du Rat, GREENSTEIN et LEUTHARDT (44), cancers avec métastases multiples. WEIL (99), SURE, KIK, BUCHANAN, THATCHER et de GROAT (96).

Par contre, des activités typiquement faibles ont été signalées dans les maladies ostéolytiques (ostéomalacie); dans l'hyperthyroïdisme, SANDORMAN (9I), ce fait pouvant être rattaché à l'action de l'hormone thyroïdienne sur la croissance; et enfin dans le scorbut aigû de l'enfance.

Le fait que l'accroissement de la phosphatase du sérum puisse être observé chez des malades ayant une obstruction incomplète des voies biliaires et ne présentant pas une concentration accrue de la bilirubine est attribuable à l'imperméabilité du rein à la phosphatase AI et à sa perméabilité à la bilirubine. En effet, COURTOIS et BIGET (27), BIGET (IO), n'ont jamais pu mettre en évidence la présence de phosphatase AI en quantité appréciable dans l'urine humaine chez le sujet normal.

Il n'en est pas de même chez les animaux et FLOOD et GUTMAN (39) ont signalé que l'urine de Chat renfermait une phosphatase I, absente de l'urine d'Homme et de Chien. BREEDIS, FLORY et FURTH (I4) ont dosé une phosphatase I dans l'urine de Lapin; son taux est nettement accru au cours des néphrites provoquées par les sels d'uranium. Une augmentation est également

signalée dans les suppurations aigües, ROUQUES (90) où elle est peut être attribuable à l'activité de la phosphatase des leucocytes.

2°) La phosphatase acide II a un pH optimum situé vers 5,0-5,6; elle est faiblement inhibée par l'ion magnésium et très fortement par les fluorures. Cet enzyme n'a pas été retrouvé dans les hématies et se rencontre en faibles quantités dans le sérum. GUTMAN et GUTMAN (49), LUNDSTEEN et WERMEHREN (65).

Dans les organes animaux, les sources les plus abondantes sont la prostate et les glandes préputiales, GUTMAN et GUTMAN (48), la rate et le foie, mais on la retrouve également dans de très nombreux organes (cerveau, rein, surrénales, pancréas, muscle) dans les humeurs (sperme, urine) Elle est présente chez les bactéries (B.Lacticus aerogenes, Clostridium acetobutylicum), PETT et WYNNE (77), dans le suc d'Orange, AXELROD (2); cet enzyme est d'une façon générale très répandu dans les végétaux supérieurs et les champignons.

La phosphatase II a pu être isolée des extraits ou des autolysats d'organes (prostate, foie), par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, KUTSCHER et WORNER (60), COURTOIS et BIGET (27), par adsorption sélective, ROCHE et LATREILLE (85) ou par inactivation des enzymes isodynames qui l'accompagnent. BAMANN et DIEDE RICHS (5), BAMANN et SALZER (6).

Dans le sérum, une activité fortement accrue a été observée dans certains cancers de la prostate, KUTSCHER et WOLBERGS (59), GUTMAN et GUTMAN (47). HERBERT (54) (55) a pu séparer dans le sérum la phosphatase acide de la prostate de celle d'autres origines en inactivant l'enzyme prostatique par l'alcool ou par la chaleur à 37°.

Il a été montré que l'activité élevée de la phosphatase osseuse dans le cancer de la prostate était en rapport avec la présence de métastases. HERGER et SAUER (56).

La mise en évidence par la technique de GOMORI (a) (4I) d'une quantité importante de phosphatase acide dans les métastases semble indiquer en ces points la présence de cellules prostatiques néoplasiques transplantées et ayant conservé la propriété de secréter cet enzyme. GREENSTEIN (43).

La propriété de secréter la phosphatase acide n'appartiendrait qu'aux cellules tumorales se rapprochant du type prostatique normal, mais non aux cancers d'un type plus primitif ou indifférencié. HUGGINS (57).

L'activité de la phosphatase acide du sérum subit une régression dans le traitement du cancer prostatique par orchidectomie, HUGGINS, STEVENS et HODGES (57) ou par l'action des oestrogènes de synthèse, HADDOW (52), WATKINSON, DELORY, KING et HADDOW (98). De ce fait, la détermination de l'activité de la phosphatase sérique permet de contrôler l'efficacité de ces traitements. WOLFROMM et LOISELEUR (I02).

Récemment, COUVELAIRE et LARDAT (28), ont précisé les taux d'activité pouvant permettre d'aider au diagnostic du cancer prostatique.

L'enzyme prostatique est déversé en abondance dans la secrétion externe de la prostate et le sperme en contient un taux très élevé, son dosage dans ce liquide permet de mesurer la composante prostatique de cette humeur.

LUNDQUIST (63) a étudié le rôle de la phosphatase prostatique dans le sperme et considère que sa principale fonction est l'hydrolyse de la phosphoryl-choline.

Le dosage de la phosphatase acide peut servir à l'identification médico-légale des taches de sperme. HANSEN (53).

(a); La méthode de GOMORI permet la localisation de la phosphatase dans les tissus; ceux-ci sont mis en contact avec un substrat au β glycérophosphate de sodium en présence de nitrate de calcium; il y a formation, aux endroits où la phosphatase est active, de phosphate de calcium qui peut être observé sur les coupes.

Contrairement au sérum, l'urine ne renferme que de la phosphatase II et cet enzyme y a été jusqu'ici peu étudié. COURTOIS et BIGET (27) BIGET (IO) n'ont jamais pu identifier de phosphatase I dans l'urine, même dans la maladie de PAGET qui s'accompagne d'une hyperphosphatasémie considérable.

L'urine de Femme renferme une phosphatase II qui possède de nombreuses analogies avec celle du sérum. Chez l'Homme, l'activité de l'urine est plus élevée que chez la Femme, WOLBERGS (IOI), COURTOIS et BIGET (27), il vient en effet s'y ajouter l'excrétion d'enzyme d'origine prostatique.

Il parait logique d'envisager une origine sérique à la phosphatase urinaire normale, celle qui se trouve dans les urines de la Femme, des sujets prostatectomisés, dans l'urine prélevée par cytostomie et enfin mélangée à l'enzyme prostatique chez l'Homme.

Ces diverses préparations ont qualitativement les mêmes caractères, pH optimum vers 5,2; activité insignifiante en milieu alcalin, même en présence d'ions Mg^{++}, hydrolyse plus rapide du β glycérophosphate que de son isomère α, inhibition concurrente par le fluorure de sodium.

3°) Le sérum et les hématies renferment également une phosphatase acide III, de pH optimum 3,8, identifiée par ROCHE, NGUYEN VAN THOAI et BAUDOUIN (86), ROCHE, NGUYEN VAN THOAI et MARCELET (87) et DESRUISSEAUX (3I). Cet enzyme est inhibé par l'ion Mg^{++}et par les fluorures; il est activé par les thiols (cystéine).

4°) Enfin, les hématies renferment un enzyme très particulier du type IV ayant un pH optimum entre 5,0 et 6,2; ROCHE (83), SCHÄFNER et BAUER (92), SCHUCHARD (93) qui a la propriété d'hydrolyser l'α glycérophosphate beaucoup plus rapidement que son isomère β ; il est fortement activé par l'ion Mn^{++}, par la cystèine ou le glutathion et par l'acide ascorbique. Cet enzyme est très labile et ne se rencontre pas habituellement dans le sérum.

CHAPITRE II

ETUDE COMPAREE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE DU SERUM ET DE L'URINE, CHEZ L'HOMME NORMAL ET AU COURS DE DIVERSES AFFECTIONS PATHOLOGIQUES.

Nous avons étudié systématiquement chez un certain nombre de sujets normaux et de malades, l'activité phosphatasique du sérum et de l'urine à pH 8,6 (phosphatase A_1) et à pH 5,2 (phosphatase A_2), en utilisant les techniques dont la description suit.

TECHNIQUES DE DETERMINATION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE.

A) PHOSPHATASE ALCALINE I

I°) DOSAGE DANS LE SERUM :

Nous avons utilisé la technique classique de BODANSKY (II) (75) (36) en opérant sur le sérum centrifugé le plus tôt possible après le prélèvement, sans addition d'anticoagulant.

2°) RECHERCHE DANS L'URINE :

Nous avons utilisé le substrat suivant

(◊ Glycérophosphate disodique 5 H^2O	6,I2	g.
) Diéthylmalonylurée pure	I8,40	"
) Soude, solution N/I	85,2	cm^3
(Eau distillée, q.s. pour	900	"

Il est préparé en faisant dissoudre la diéthylmalonylurée dans la soude N en tiédissant légèrement, ajoutant ensuite le ◊ glycérophosphate de sodium et complétant au volume indiqué avec de l'eau distillée privée de CO^2 par ébullition.

Le pH doit être voisin de 8,6; on le vérifie en présence de Bleu de Thymol. Ce substrat peut être conservé quelques semaines à la

glacière en le recouvrant d'une couche de toluène pour empêcher les microorganismes. générateurs possibles de phosphatases de s'y développer.

Dans un flacon stérile, nous mélangeons 5 cm^3 d'urine et 45 cm^3 de substrat et nous ramenons le mélange à pH 8,6 par addition de quelques gouttes de soude N/IO en présence de Bleu de Thymol; nous ajoutons I cm^3 de toluène. Le flacon bouché est placé en incubation dans un thermostat à bain d'eau à 37° pendant 48 heures généralement, quelquefois pendant une semaine dans le cas où l'activité phosphatasique est très faible.

Nous préparons un témoin, avec 45 cm^3 de substrat, ne contenant pas d'urine, que nous plaçons dans les mêmes conditions à 37°, et dans lequel nous ajoutons l'urine (conservée pendant ce temps à la glacière) au moment de pratiquer le dosage de l'acide phosphorique.

L'acide phosphorique est précipité par la mixture magnésienne ammoniacale; après 24heures, le précipité est séparé par filtration; nous le redissolvons dans IO cm^3 d'acide nitrique dilué au I/2 et lavons avec I5 cm^3 d'eau. L'acide phosphorique est alors dosé à l'état de complexe aqueo-éthéro-molybdique par la technique de COPAUX (22) (IO).

La différence entre les deux dosages donne la quantité d'acide phosphorique hydrolysé par action de l'enzyme.

En opérant dans ces conditions, nous pensons nous être prémunis de façon suffisante contre les erreurs dues à la présence d'acide phosphorique libéré à partir du substrat par le séjour à 37° (hydrolyse très minime à ce pH), ainsi que contre la présence de microorganismes indésirables dans le substrat (bactéries) pouvant produire une hydrolyse minime.

En opérant les dosages dans des conditions rigoureusement identiques, nous devions être à même de saisir de très faibles hydrolyses après une durée de reaction suffisamment prolongée.

Pour nos essais, nous avons utilisé l'urine fraichement émise et recueillie aussi aseptiquement que possible.

B) PHOSPHATASE ACIDE II

Nous avons adopté une technique calqués sur celle de BODANSKY, en choisissant toutefois un tampon de pH approprié et en augmentant la durée d'hydrolyse pour compenser la faible activité de la phosphatase acide du sérum.

Comme tampon, nous avons choisi le système acide acétique-acétate de sodium dont le champ d'action est compris entre pH 3,7 et 5,6 et qui possède encore un pouvoir tampon satisfaisant aux environs de pH 5,2.

Nous avons éliminé le tampon acide citrique-NaOH, l'acide citrique, donnant des complexes molybdiques, perturbe le dosage des orthophosphates. LUNDSTEEN (64). BRIGGS (I5).

Dans un souci de normalisation et afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec divers substrats, nous avons adopté les conditions d'hydrolyse suivantes :

a) Concentration en substrat = 0,02 M en PO^4H^3.

b) Concentration en Tampon 0,I N (en acide)

c) Concentration en sérum (ou urine) I/I0° ou moins.

que nous avons réalisées en utilisant la solution suivante de substrat tamponné :

(	β Glycérophosphate disodique 5 H^2O	6,I2 g.
)	Acide acétique, solution N/I	I00. cm³
)	Soude, solution N/I	68. "
(	Eau distillée, q.s. pour	900. "

Il a été tenu compte, pour établir cette formule qu'il est nécessaire d'utiliser

23 cm^3 d'acide acétique N/I pour amener a pH 5,2 une solution de 6,I24 g. de β glycérophosphate disodique dans I000 cm^3 d'eau, et de ce que, pour le système acétique-acétate N/I0, un pH de 5,2 est obtenu lorsque 79 p.I00 de l'acide se trouvent neutralisés.

Ce substrat a un pH de 5,2 (vérifié au Rouge de Méthyle et à l'électrode de verre). Il peut se conserver quelque temps à la glacière, sous toluène, mais il s'hydrolyse à la longue par l'action de l'acide acétique. Il faut éviter avec soin son invasion par les moisissures se développant en milieu acide et qui sont génératrices de phosphatases II actives. Il vaut mieux le préparer au moment du besoin.

9 cm^3 de cette solution contiennent 6,2 mg. de P libérable sous forme d'acide orthophosphorique, soit I9,6 mg. de PO^4H^3.

Nous nous sommes placés dans des conditions telles que l'hydrolyse ne dépasse pas 20 p.I00 du substrat, en diluant au besoin les préparations diastasiques.

Le sang a été recueilli dans un tube à centrifuger sans addition d'anticoagulant (les oxalates et surtout les fluorures étant inhibiteurs); le sérum est séparé par centrifugation énergique aussitôt après la coagulation et le dosage effectué le plus rapidement possible, la phosphatase II étant assez labile en milieu faiblement alcalin.

Le sérum a un pH voisin de 7,4 et c'est un fait connu qu'un enzyme se conserve d'autant mieux qu'il se trouve dans un milieu de pH voisin de son pH optimum d'activité. HERBERT (55) a montré que la phosphatase prostatique était complètement inactivée dans le sérum par séjour à 37° pH 7,4 pendant une heure.

I°) DOSAGE DANS LE SERUM :

Dans deux tubes à essais stériles, nous mesurons les volumes de réactifs suivants :

	Tube Témoin	Tube Dosage
Solution de substrat	9 cm^3	9 cm^3
Sérum frais	0	I "

le tube est bouché avec un bouchon caoutchouc et maintenu à 37° pendant 24 heures. Le sérum restant est conservé, pendant ce temps , à la glacière.

Au terme de l'hydrolyse, ajouter :

Sérum	I cm^3	0
puis aussitôt :		
Acide trichloracétique solution à 25 g.pour I00 cm^3	2 "	2 cm^3

Agiter - Laisser en contact I5 minutes - Filtrer sur un filtre sans cendres.

DOSAGE DU PHOSPHORE LIBERE SOUS FORME D'ORTHO-PHOSPHATE , par la méthode de BELL et DOISY (9) modifiée par BRIGGS (I5).

REACTIFS

Solution Etalon A de phosphate :

(Phosphate monopotassique pur) aphydre (PO^4H^2K)	0,43885 g.
) SO^4H^2 pur	I0 cm^3
(Eau distillée, q.s. pour	I000 " à I5

à conserver en flacon bouché à l'émeri.
Cette solution contient I00 microgrammes de P par cm^3.

Réactif sulfomolybdique :

(Molybdate d'ammonium	5 g.
) SO^4H^2 pur	I5 cm^3
(Eau distillée, q.s. pour	I00 "

Il y a intérêt à préparer ce réactif quelques jo à l'avance et à le décanter; il se produit parfo une teinte jaune suivie d'une légère précipitati due aux traces de phosphore ou d'arsenic contenu

dans les réactifs et surchargeant légèrement la coloration bleue lors du dosage.

Solution de sulfite :

(Sulfite de sodium anhydre 4 g.
) Eau distillée, q.s. pour 20 cm^3

on peut employer aussi bien une dilution récente au I/5e de la solution de bisulfite de sodium du Codex.

Solution d'Hydroquinone :
à préparer extemporanément

(Hydroquinone 0,I00 g.
) SO^4H^2 à I0 p.I00 2 gouttes
) Eau distillée, q.s. pour 20 cm^3

On réalise le dosage colorimétrique de la façon suivante :

	Tube Standard (contenant 50 de P)	Tube Témoin	Tube Réaction
Solution Etalon A de phosphate	0,50 cm^3		
Eaud·distillée	5,50 "	6 cm^3	6 cm^3
Réactif sulfomolbdique	2 "	2 "	2 "
Solution de sulfite	I "	I "	I "
Solution d'hydroquinone	I "	I "	I "

Mélanger après chaque addition; il apparait une coloration bleue qui se développe progressivement. On fait la comparaison colorimétrique au bout de 30 minutes au colorimètre de Duboscq en examinant le tube standard sous une épaisseur de I5 millimètres, ou au photomètre.

On calcule la teneur en P en raison inverse des hauteurs sous lesquelles le liquide est examiné à égalité de teinte; le tube standard correspondant à une teneur de 50 microgrammes de phosphore.

Cette réaction est très régulière; elle n'est pas influencée sensiblement par l'acide trichloracétique, lorsque l'on dispose d'un produit pur; elle vérifie de façon satisfaisante la loi de BEER-LAMBERT, ainsi que l'a montré récemment BARAC (7), ce qui confirme nos propres observations à ce sujet.

Elle est gênée par la présence d'oxalates, de citrates (I5); les arséniates donnent, dans ces conditions, une coloration bleue très faible au bout de 30 minutes mais qui continue à évoluer très lentement pendant plus de 24 heures.

Nous exprimons l'activité phosphatasique en mg. de phosphore (a) libéré par hydrolyse en 24 heures à 37°, dans les conditions précisées plus haut, rapportée à I00 cm^3 de sérum.

2°) DOSAGE DANS L'URINE :

L'activité phosphatasique urinaire variant notablement au cours de la joutnée (27)(I0) l'urine est prélevée au moment de la prise de sang (le matin). Nous avons adopté le mode de prélèvement couramment utilisé pour la détermination de la Constante d'Ambard.

(a): Il serait plus logique d'exprimer les résultats en mg. d'acide phosphorique libéré par hydrolyse, mais nous avons dû pour les résultats cliniques nous plier à l'habitude acquise dans les milieux médicaux, par l'emploi des "Unités Bodansky" pour la phosphatase AI, d'exprimer les résultats en mg. de phosphore. Les auteurs américains utilisant le mono-phénylphosphate comme substrat expriment leurs résultats en mg. de phénol libéré par hydrolyse, ce qui rend encore plus vain tout effort de comparaison immédiate entre les diverses unités utilisées.

Nous avons utilisé le même substrat que précédemment dans les conditions suivantes :

Dans un flacon stérile, nous mélangeoons 5 cm^3 d'urine avec 45 cm^3 de substrat à pH 5,2, et nous ramenons le mélange à pH 5,2 par addition de quelques gouttes d'acide acétique N/IO (en présence de rouge de méthyle). Nous ajoutons Icm^3 de toluène et nous plaçons dans un thermostat à 37° pendant 24 heures.

Nous préparons un témoin sans urine, avec 45 cm^3 de substrat, placé à 37° dans les mêmes conditions et auquel nous ajoutons l'urine (conservée pendant ce temps en glacière) au moment du dosage de l'acide phosphorique.

L'acide phosphorique est dosé dans les deux flacons comme nous l'avons indiqué plus haut pour la phosphatase alcaline de l'urine. (technique de Copaux).

Comme pour le sang, les résultats sont exprimés en mg. de P libéré par une hydrolyse diastasique de 24 heures à 37°, dans les conditions décrites ci-dessus, en le rapportant à IOO cm^3 d'urine.

DOSAGES CLINIQUES

Nous avons examiné un certain nombre de sujets présumés en bonne santé afin de connaitre les valeurs moyennes données par notre technique.

Puis nous avons examiné le sang et l'urine de quelques malades atteints d'affections susceptibles d'amener des variations de l'activité phosphatasique; nos résultats sont consignés dans le tableau n°I.

DISCUSSION DES RESULTATS

L'examen des chiffres nous permet de tirer quelques conclusions.

Tableau I

ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DU SERUM ET DE L'URINE CHEZ L'HOMME NORMAL ET DANS DIVERSES AFFECTIONS PATHOLOGIQUES.

Sujet	Affection	Phosphatase alcaline I		Phosphatase acide II	
		sérum	urine	sérum	urine
Plu....	sujet présumé normal		0		I4I,0
Col....	d°	I,I		3,6	
Hur....	d°	5,7		0,8	
Rob....	d°	3,0		I,0	
Per....	d°	9,5		4,I5	
Rob....	d°	5,35		4,85	
Que....	d°	I,8		0,25	
Lin....	d°	I,3	0	0,9	70,0
Pea....	d°	7,3		4,2	
Ma.....	d°		4		70
Pu.....	d°		I3		253
Mo.....	d°		5		53
Fer....	d°		8		II8
Ric....	cancer des os avec métastases	38,0		27,2	
Ric....	d°	29,0	0	I0,9	96,0
Mul....	cancer généralisé	2,5	0	3,4	0
Clo....	ostéomalacie	I6,6	0	8,8	67;0
Fra....	otospongiose	I,6		3,8	
Fra....	d°	4,I	0	3,7	65,0
Mar....	d°	4,5	0	I5,3	85,0

Del....	exostose ostéogénique (mal. de Besselhagen	4,0		I,75	
Mag....	d°	3,0	0	2,4	II0,0
Fer....	d°	3,3	0	28,0	I75,0
Gol....	d°	5,0	0	I3,0	33,5
Car....	sacrocoxalgie avec ostéite	I,69		5,I2	
Jac....	Ictère	I4,0	0	I2,0	70,0
Jac....	d°	6,8	0	8,0	67,0
Pic....	d°	2,0		9,2	
Gue....	Ictère par rétention	23,0	I4	I3,2	48,0
Ne.....	adénome prostatique	I,5	I5	3,I5	I45
Rich...	d°	I,I	I0	3	3I0
An.....	prostatite	3,0	24	4,4	I36
Bau....	cancer de la prostate	0,7	2	4,2	4,0
Col....	d°	2,9	0	I,5	3I,0
Pel....	d°	I,3	4	I,8	0
Rip....	d°		4	7,5	30,0
Sav..I°	d°	I,77	0	I3,78	
Sav..2°	d° (après traitement par les oestrogènes de synthèse)	6,4	0	I,9	252

Les chiffres expriment le nombre de milligrammes de phosphore libérés par I00 cm^3 de sérum ou urine dans les conditions opératoires décrites. Pour la phosphatase I sérique, ils s'identifient avec les unités Bodansky.

Envisageons tout d'abord les activités des phosphatases I :

I°) Quel que soit le taux de l'enzyme sérique, l'urine ne présente qu'une très minime activité en milieu alcalin, qui ne permet pas d'affirmer la présence normale dans l'urine humaine de phosphatase AI; les hydrolyses légères observées ne dépassent pas le cadre des erreurs expérimentales; d'ailleurs, dans la plupart des cas, où nous avons observé de légères hydrolyses, il s'agissait de malades dont l'urine prélevée par cytostomie pouvait contenir de faibles quantités de pus, les leucocytes renfermant une phosphatase A_I active.

Il est cependant intéressant de signaler que chez les deux sujets étudiés atteints d'adénome prostatique et dans le cas de prostatite, l'urine présente une activité phosphatasique I appréciable. De même, certains des sujets atteints d'un cancer de la prostate possédaient une très légère phosphatasurie I. Nous nous bornerons à formuler cette remarque sans tenter les généralisations natives car certains sujets normaux ont excrété un peu de phosphatase I dans l'urine.

2°) Les variations de la phosphatase alcaline I sérique appellent quelques commentaires. Comme le fait était déjà connu, son taux est accru dans le cancer des os; dans deux ictères sur quatre, nous retrouvons ainsi l'influence de l'obstruction des voies biliaires, qui était confirmée cliniquement dans l'un des cas. Son taux a été trouvé normal dans l'otospongiose et la maladie de Besselhagen.

Les variations de l'activité des phosphatases acides permettent de préciser plusieurs points :

3°) Il n'y a pas de relations régulières entre les activités phosphatasiques acides du sérum et de l'urine.

Dans les cas pathologiques où l'activité du sérum est considérablement accrue, l'activité de l'urine ne dépasse pas la normale qui est assez difficile à préciser.

4°) L'activité phosphatasique II de l'urine de Femme parait subir de moins grandes variations que chez l'Homme et l'on peut considérer comme normaux les chiffres voisins de 70 unités.

Pour l'Homme, les variations sont beaucoup plus considérables, car il s'ajoute vraisemblablement une composante prostatique à la phosphatase II diffusant du rein. Chez un sujet adulte, on peut admettre comme normales des valeurs 2 à 3 fois plus élevées que chez la Femme.

5°) La phosphatase acide II du sérum libère, dans nos conditions expérimentales de I à 5 mg. de phosphore; le taux varie assez sensiblement d'un individu à l'autre. Cette activité est considérablement accrue dans le cancer des os avec métastases. GUTMAN et ROBINSON (51) avaient d'ailleurs signalé un net accroissement dans les métastases des tumeurs. Le taux de phosphatase II augmente d'une façon plus ou moins nette dans les quatre sérums ictériques; son taux est nettement au-dessus de la normale dans deux cas de maladie de Besselhagen sur les quatre étudiés. Elle est à peine augmentée dans le cas d'ostéomalacie et demeure normale deux fois sur trois dans l'otospongiose.

6°) Dans les cancers de la prostate étudiés nous avons trouvé quelques cas n'ayant pas entrainé d'élévation de la phosphatase acide. Toutefois, dans un cas typique (Sav...), nous avons enregistré un taux élevé, cette valeur ayant subi une régression très importante par le traitement par les oestrogènes de synthèse; ce fait confirme les observations récentes de COUVELAIRE et LARDAT (28) qui ont utilisé notre technique pour l'étude d'un plus grand nombre de sérums de malades atteints de cancer prostatique et en ont tiré des conclusions intéressantes.

Dans les cas de cancers de la prostate accompagnés de nombreuses métastases, LUNDSTEEN et VERMEHREN (65), les GUTMAN (49) ont observé des augmentations considérables d'activité; et ce sont vraisemblablement les tissus cancéreux des métastases qui sont responsables de ces teneurs élevées.

Chez tous les malades atteints de cancer de la prostate que nous avons étudiés, nous n'avons pas rencontré de rapport entre les activités phosphatasiques II du sérum et de l'urine, cette dernière pouvant être normale, très faible dans certains cas : malades présentant un mauvais état général; ou même nulle dans d'autres cas où l'alcalinité de l'urine avait entrainé la disparition précoce de la phosphatase acide.

CONCLUSIONS :

Nous n'avons pas trouvé de rapports nets entre les activités phosphatasique I et II du sérum et de l'urine, aussi bien chez les sujets normaux que chez ceux atteints de diverses affections.

CHAPITRE III

ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DU SERUM ET DE L'URINE CHEZ DIVERSES ESPECES ANIMALES.

Nous nous sommes proposés dans ce chapitre d'étudier la répartition des phosphatases I et II dans le sérum et l'urine de divers mammifères appartenant à des espèces assez distinctes et d'un Gallinacé, le Coq, afin de rechercher les rapports que nous n'avions pu mettre en évidence chez l'Homme entre leurs activités dans le sang et dans l'urine.

TECHNIQUE

Nous avons utilisé pour ces recherches les substrats et les techniques indiqués dans le précédent chapitre. Toutefois, nous avons prolongé les durées d'hydrolyse; c'est ainsi que pour le sérum, nous maintenons à 37° I heure et 24 heures pour la phosphatase I, 24 et 48 heures pour la phosphatase II; avec l'urine, 48 et I20 heures pour la recherche de la phosphatase I et 24 et I20 heures pour la phosphatase II; nous avons opéré ainsi afin de réduire les erreurs expérimentales pour les très légères hydrolyses. Comme dans les cas précédents, nous avons exprimé les résultats en mg. de P minéral libéré sous forme d'acide ortho-phosphorique pour I00 cm^3 de sérum ou d'urine.

Les urines animales recueillies dans des récipients stériles ont été conservées sous toluène et étudiées le plus rapidement possible après l'émission (a).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau n°II; nous avons joint à titre comparatif les valeurs normales chez l'Homme.

(a) : Nous remercions Monsieur le Professeur URBAIN et Monsieur le Docteur NOUVEL du Muséum National d'Histoire Naturelle, qui eurent la bienveillance de nous procurer certains échantillons analysés.

Tableau II

ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DU SERUM ET DE L'URINE
CHEZ DIVERSES ESPECES

	SERUMS				URINES			
	I		II		I		II	
	I H.	24 H.	24 H.	48 H.	48 H.	I20 H.	24 H.	I20 H.
HOMINIENS								
Homme adulte(moyen.)	4,4	54	3,I5	5,65	6,5	4	I45	635
Enfant ♂ 7 ans	8,I	98	2,2	4,5	6	6	II8	3I4
Femme adulte	4,I	45	3	5,4	4	6	70	253
" gestante	6,2	59	2,8	4,7	4	I,5	I27	358
Enfant ♀ 4 ans	9,I	I07	I,7	3,3	5	8	53	I25
SIMIENS								
Chimpanzé ♂					I5,3	30,6	2	6,5
ELEPHANTIDES								
Eléphant d'Asie ♀					0	0,8	0	2,2
" " ♀					0	0	I	2

EQUIDES								
Cheval étalon de race Percheronne					0	0	0	0
Jument	I,92	23,8	9,3	I7	0	0	0	0
Cheval entier IO ans(néphrite)	I.5	I5,4	8,I	I4,7	39	22	4,3	4
SUIDES								
Porc ♂	I,75	36	6;9	I0,8	0	44	55	204
Porc ♂	2,05	I8,4	I4,9	23,3	4,3	8,7	83	I64
BOVIDES								
Taureau jeune	0		8		0		9,6	
Vache	0,7	I0,3	3,65	7,65	0	0	0	0
Vache	0,05	5,3	2,8	4,9	0	0	0	0
Veau ♂	5,5	72,4	3,3	I0,6	0	I,7	6,I	8,7
Veau	5,I	74,I	2,2	4,7	6,5	6,5	I0,9	42,2
Veau	7,6	74,2	3,5	5,4	0	I3	22	36,6
OVIDES								
Agneau ♂	I,6	I6,6	I,6	4,I	4,3	6,5	I0,9	24
GIRAFFIDES								
Girafe gestante					0,4	2,2	I,I	4,3
" "					2	2	0	0

Tableau II (suite)

	SERUMS				URINES			
	I		II		I		II	
	I H.	24 H.	24 H.	48 H.	48 H.	I20 H.	24 H.	I20 H.
CAMELIDES								
Dromadaire ♂					0	0	I,I	5,2
" ♂					2	0	0	0
CANIDES								
Chien ♀					8,6	8,6	0	I3
FELIDES								
Chat ♂					34	54	6	I,6
Chat ♀					43	I05	I05	52,5
LEPORIDES								
Lapin ♀	I,3	9,5	2,9	6,I	28	75	0	0
Lapin ♂					8,7	2,6	8,7	9,6
GALLINACES								
Coq	5	39,I	5,6	8,7				

Les chiffres expriment le nombre de milligrammes de phosphore libérés par I00 cm^3 sous forme d'acide ortho-phosphorique, par I00 cm^3 de sérum ou urine dans les conditions opératoires décrites.

DISCUSSION DES RESULTATS

Nos résultats sont réunis dans le tableau II. Les chiffres expriment le nombre de milligrammes de phosphore minéral libéré sous forme d'acide orthophosphorique par la phosphatase, rapportés à 100 cm³ de sérum ou d'urine dans les conditions définies ci-dessus.

Envisageons en premier lieu les résultats obtenus avec le sérum. Chez toutes les espèces dont nous avons pu examiner le sérum, nous avons chaque fois décelé des phosphatases des types I et II. Les hydrolyses de 24 heures avec des quantités égales de substrat à des pH différents indiquent que la phosphatase I a une action plus marquée que la phosphatase II.

Les écarts sont plus ou moins importants; ils sont particulièrement nets chez les jeunes animaux : Veau - Agneau, où la phosphatase I libère 10 à 20 fois plus d'acide phosphorique que l'enzyme II. Le rapport des vitesses de réaction n'étant que de 2 à 3 chez les animaux adultes; le fait est particulièrement significatif chez les Bovidés : les activités phosphatasiques II du Veau et de la Vache sont du même ordre de grandeur; au contraire, la phosphatase I du Veau est au moins huit fois plus active que celle de la Vache. C'est d'ailleurs un fait bien établi que le taux en phosphatase I du sérum est plus élevé chez les sujets en voie de croissance que chez les adultes. SMITH et MAIZELS (95), BODANSKY (12), ROSAHN(89) ALLCROFT et FOLLEY (1). Cette propriété plaide en faveur de l'origine osseuse d'une partie importante de la phosphatase I sérique. L'os, très riche en phosphatase I, ne renferme qu'une très minime proportion de phosphatase II, WOODARD(103) Il n'est donc pas surprenant que le taux en phosphatase II sérique soit à peu près identique chez les jeunes Bovidés et les adultes.

Chez les animaux adultes, les activités phosphatasique I sont du même ordre de grandeur; les écarts observés d'une espèce à une autre ne sont pas sensiblement plus accentués que les différences individuelles constatées dans le cadre d'une même espèce.

Nous mentionnerons cependant le fait que la phosphatase I du Coq est plus active que celle des Mammifères adultes. Les écarts entre les diverses espèces apparaissent être plus importants pour la phosphatase II.

Par contre, les résultats obtenus avec les urines sont beaucoup plus différenciés que ceux obtenus avec le sérum.

Une activité phosphatasique I infime et parfois nulle s'observe chez l'Eléphant. le Cheval, les Bovidés, la Girafe et le Dromadaire. Les urines de Porc, Agneau, Chien, Chimpanze renferment une faible proportion de phosphatase I; par contre, celles du Chat, du Lapin sont très nettement actives. L'urine de l'un des Chevaux atteint de néphrite a montré une nette activité; dans ce cas, c'est à la faveur des lésions rénales que la phosphatase I a extravasé dans l'urine. D'ailleurs FLOOD et les GUTMAN (39) avaient déjà signalé que l'urine du Chat renfermait une phosphatase I, absente des urines d'Homme et de Chien. BREEDIS, FLORY et FURTH(I4) ont dosé une phosphatase I dans l'urine du Lapin; son taux est nettement accru au cours des néphrites provoquées par injection d'un sel d'uranium.

Dans l'ensemble, il n'existe aucune relation entre les activités phosphatasiques I du sérum et de l'urine; nous n'avons observé qu'une exception de faible importance : le sérum du Veau est plus actif que celui de la Vache; l'urine de Veau présente une très faible activité tandis que celle de la Vache est inactive. Il est donc possible que l'hyperphosphatasémie notable du Veau s'accompagne d'une légère diffusion de phosphatase I dans l'urine (a).

En ce qui concerne la phosphatase II, les urines d'Eléphant, Cheval, Girafe, Dromadaire

(a) : P.BIGET (IO) n'a pu déceler de phosphatase active dans l'urine de divers sujets hyperphosphatasémiques atteints de la maladie de Paget.

Chien, Lapin et Singe en sont privées ou n'en renferment qu'une proportion infime. Les urines de Veau, Agneau et Chat en contiennent d'une façon appréciable, mais c'est l'urine de Porc qui est de beaucoup la plus active, activité qui est comparable à celle de l'urine humaine.

Il ne parait pas exister de relation entre les teneurs en phosphatase II du sérum et de l'urine; c'est ainsi que, tandis que les sérums de Cheval et Porc ont des activités sensiblement identiques, l'urine de Porc est de beaucoup plus riche en phosphatase que celle du Cheval, qui en est pratiquement dépourvue.

Cependant, nous pouvons faire quelques remarques générales importantes concernant l'influence de l'alimentation sur le taux de phosphatase II dans l'urine des animaux. Les herbivores n'éliminent pas en général de phosphatase II, sauf les animaux jeunes (Veau, Agneau) où intervient l'alimentation lactée. Les animaux ayant une alimentation plus variée : Porc, Chien Chat domestique, ont une élimination de phosphatase acide qui parait grossièrement en rapport avec la teneur en phosphore minéral de l'urine, sans que l'on puisse cependant établir une relation directe. Il s'y ajoute peut être, comme chez l'Homme, une fraction d'enzyme prostatique, mais nous avons remarqué que les animaux d'élevage, qui dans certains cas sont castrés, Boeuf, Porc, ont une prostate très peu développée; il en est de même pour les espèces à coït rapide, Cheval étalon, Taureau.

Le fait que ces animaux ont une prostate peu développée et peu active, met en relief avec davantage de netteté l'influence de l'alimentation et il est permis de penser que la phosphatase acide joue un rôle dans l'élimination des phosphates au niveau du rein.

ACTIVITES PHOSPHATASIQUE DES PROSTATES DE DIVERSES ESPECES.

Nous avons complété ces essais en comparant les activités phosphatasiques acides des prostates de certaines des espèces étudiées. Aussitôt après le prélèvement, nous broyons le tissu prostatique avec du sable fin lavé et stérilisé puis laissons macérer I2 heures à la glacière dans I00 parties de Soluté physiologique à 9 p. I000 saturé de toluène. Après filtration, nous déterminons l'activité en mettant en contact I cm^3 du liquide avec 50 cm^3 du substrat de pH 5,2 utilisé pour les essais avec le sérum et l'urine. Nous exprimons les activités en millig. de P libéré sous forme d'acide orthophosphorique en 24 heures à 37° par I g. de tissu frais.

Tableau III

ACTIVITES PHOSPHATASIQUES
DES PROSTATES DE DIVERSES ESPECES

Origine de la glande	Homme (I)	Homme	Taureau	Boeuf	Porc
Activité phosphatasique	700	2090	I00	80	70

(I) prostate réséquée par endoscopie

Les chiffres indiquent le nombre de mg. de P libéré sous forme d'acide orthophosphorique par g. de tissu frais.

Ainsi que l'avaient déjà signalé les GUTMAN (48), l'activité de la prostate humaine est très nettement supérieure à celle des autres mammifères (a).

(a): Nous remercions Mr. le Docteur BOUTRON, chirurgien à NOGENT-le-ROTROU qui eut l'obligeance de nous fournir certains échantillons analysés.

Il ne parait pas exister de relation entre les teneurs en phosphatase de la prostate et de l'urine; en effet, tandis que les activités phosphatasiques des prostates de Taureau, Boeuf et Porc sont assez proches, l'urine de Porc est de beaucoup plus riche en phosphatase II que celles des Bovidés.

CONCLUSIONS :

I°) Chez les animaux étudiés, il ne parait exister aucune relation entre les activités phosphatasiques I ou II du sérum d'une part et de l'urine d'autre part. Tandis que l'on n'observe que de minimes écarts entre les activités des sérums de diverses espèces, on peut relever de très notables divergences entre les activités phosphatasiques urinaires;

Parmi les espèces étudiées, les urines de Chat et Lapin sont nettement les plus riches en phosphatase alcaline I et on peut considérer comme une particularité chez ces espèces la perméabilité relative du rein à cet enzyme.

2°) Les urines d'Homme, de Porc, de Veau, d'Agneau, de Chat sont considérablement plus riches en phosphatase acide II que les urines des Herbivores adultes, ce qui met en évidence le rôle de l'alimentation dans l'élimination de la phospnatase II.

3°) Il n'a pas été relevé de rapport entre les activités phosphatasiques II de la prostate et de l'urine.

D E U X I E M E P A R T I E

ESSAIS DE PURIFICATION DE LA PHOSPHATASE URINAIRE.

Les différents constituants de l'urine, en particulier les phosphates qui sont inhibiteurs, peuvent avoir une influence sur le résultat des dosages et modifier les propriétés de la phosphatase urinaire, aussi en vue de nos essais, nous avons essayé d'obtenir des préparations aussi purifiées que possible.

Nous inspirant des travaux de BIGET qui a réussi à obtenir des préparations actives par relargage à l'aide du sulfate d'ammonium, nous avons tenté de préciser cette technique; ensuite nous avons recherché si par d'autres modes de précipitation, en particulier à l'aide de l'alcool ou de l'acétone, nous pourrions obtenir une phosphatase active et purifiée. Nous nous proposions également par ces recherches d'observer à partir de quelle concentration la phosphatase était précipitée, espérant obtenir de cette façon des renseignements sur la nature protéique de l'apoenzyme; enfin, nous avons tenté de fixer la phosphatase urinaire sur des précipités formés au sein de l'urine.

CHAPITRE I

ENTRAINEMENT PAR LES MOUSSES ET RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM.

I°) Entrainement par les mousses.

Nous nous sommes inspirés de la technique de moussage décrite par DOGNON (32). Cette méthode utilise la propriété que possèdent les substances tensioactives de se concentrer à la surface des liquides; elle permet, par la production de mousses qui renouvellent constamment la surface, de concentrer certains principes, se trouvant à l'état très dilué, dans le liquide résultant de la résorption de la mousse.

Ces techniques ont été utilisées pour la concentration des bactéries dans un volume de liquide réduit. DOGNON et DUMONTET (33).

TECHNIQUE

Nous avons utilisé l'appareillage décrit par DOGNON (32); il se compose d'un tube de verre horizontal formant cheminée et recourbé à son extrémité supérieure. La partie inférieure est en communication avec un ballon contenant le liquide à traiter, dans le cas qui nous intéresse l'urine. Dans le fond du ballon se trouve un ajutage percé de petits trous par lequel on fait arriver un courant d'air à débit, réglable, produit par une trompe soufflante d'un modèle quelconque.

Nous avons traité dans cet appareil 200 cm^3 d'urine en réglant l'arrivée d'air de façon à obtenir une montée régulière de la mousse dans la colonne, puis sa sortie bulle à bulle à l'extrémité de l'appareil. La mousse ainsi recueillie tombe dans une capsule où nous avions préalablement déposé quelques gouttes de suspension aqueuse d'alcool *n.* octylique.

La mousse se résout rapidement en un liquide notablement plus coloré que l'urine mise en traitement. Nous avons mesuré l'activité phosphatasique à pH 5,2 selon la technique décrite précédemment pour l'urine (p.I8).

Résultats

	PO^4H^3 libéré par hydrolyse (en mg.)
Urine non traitée	20,7
Urine restant dans l'appareil	20,7
Liquide de résorption de la mousse	20,7

CONCLUSIONS :

Après avoir répété plusieurs fois ces essais avec des échantillons d'urine distincts, nous en avons déduit qu'il n'y avait pas dans ces conditions de concentration de la phosphatase urinaire par ce procédé. Nous avons seulement observé une concentration des pigments urinaires.

Ces résultats décevants, dans ce cas particulier, ne nous ont pas encouragé à poursuivre nos essais dans ce sens.

2°) Essais de purification de la phosphatase urinaire par relargage au sulfate d'ammonium.

Nous avons essayé de préciser à partir de quelle concentration en sulfate d'ammonium, la phosphatase était relarguée. Pour simplifier les exposés, selon une notation utilisée par SORENSEN, nous avons désigné le pourcentage de solution saturée en sel dans les milieux étudiés par un chiffre entre guillements, par exemple : "60" signifie ici "précipité obtenu à 60 p. 100 de la saturation en sulfate d'ammonium à la température de 15°".

C'est ainsi que pour relarguer à "50" 10 cm^3 d'urine d'Homme sont additionnés de 40 cm d'eau distillée puis de 50 cm^3 de solution saturée à la température de 15° de sulfate d'ammoniu

La préparation est abandonnée à 15° pendant 12 heures. Au bout de ce temps, nous filtrons sur Büchner (en utilisant seulement le centre du filtre afin de bien rassembler le précipité); le précipité essoré est placé avec le filtre dans une fiole avec 10 cm^3 de solution M/10 de β glycérophosphate de sodium de pH 5,2, 10 cm de solution tampon acide acetique-acétate de sodium à pH 5,2, de l'eau distillée pour amener à 50 cm^3 et 1 cm^3 de toluène. Le flacon est maintenu 24 heures à 37°. Au bout de ce temps, l'acide phosphorique libéré est précipité à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien, puis dosé suivant la technique de Copaux.

Dans les mêmes conditions, nous avons effectué le relargage aux concentrations "66" "75" "80" "100". Les précipités obtenus ainsi ne renfermaient que des traces de phosphore minéral.

Tableau IV

ACTIVITE PHOSPHATASIQUE DES PRECIPITES OBTENUS PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

Concentration en SO^4Am^2 (en % de la saturation)	Apparence du précipité	PO^4H^3 libéré par hydrolyse en mg.
Essai témoin (1)	nul	31, 0
"50"	très faible	I,4
"66"	" "	5,I
"75"	léger	I,4
"80"	"	I,4
"100"	net milieu trouble.	I2,4
l'hydrolyse totale du substrat libèrerait 98 mg. de PO^4H^3.		

(1) mesure de l'activité phosphatasique de I0 cm^3 d'urine.

Une faible partie de l'activité phosphatasique se trouve relarguée à "66"; ceci doit correspondre à des conditions optima, car nous ne retrouvons pas cette activité aux concentrations "75" et "80"; une partie plus importante est précipitée à "100".

Ces faits nous amènent à reconsidérer le problème de l'homogénéité de la phosphatase urinaire; en effet, nous ne sommes pas certains que la fraction relarguée à "66" soit identique à celle qui précipite à "100". Le précipité ne présente d'ailleurs pas le même aspect, celui obtenu à "100" est difficile à redissoudre en milieu acide et il s'agit davantage d'une précipitation que d'un relargage. On observe un fait

similaire pour les protéines où la fraction relarguée se redissout en général si la salinité du milieu est abaissée.

Dans les essais qui suivent, afin de pouvoir contrôler avec quelle fraction protéique se relargue la phosphatase, et aussi afin d'obtenir un précipité plus compact et partant plus facile à recueillir et à manipuler, nous avons additionné l'urine d'une petite quantité (2 pour 100) de sérum humain inactivé par chauffage à 56° pendant deux heures.

Lors du dosage terminal de l'acide phosphorique, nous faisons précéder la précipitation à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien d'une défécation qui élimine la petite quantité de protéines apportée par le précipité :

a) Défécation :

Nous ajoutons à 50 cm^3 de liquide 5cm^3 d'acide trichloracétique à 25 g. pour 100 cm^3; nous portons à l'ébullition quelques instants et nous filtrons.

b) Précipitation :

La séparation de l'acide phosphorique à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien est effectuée ensuite par addition de 20 cm^3 de mixture magnésienne et alcalinisation par l'ammoniaque en présence de phénolphtaléine.

Le dosage est terminé ensuite comme il a été déjà indiqué page 13.

Dans ces conditions, nous avons effectué de nouveaux essais de relargage, dont les résultats sont exprimés dans le tableau suivant.

Tableau V

ACTIVITE PHOSPHATASIQUE DES PRECIPITES OBTENUS PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM DE L'URINE D'HOMME ADDITIONNEE DE SERUM.

Concentration en SO^4Am^2	Apparence du précipité	PO^4H^3 libéré par hydrolyse en mg.
Essai témoin (1)	nul	58,4
"34"	"	0,8
"40"	très léger	I,4
"50"	léger	I,8
"62"	"	I2,4
"68"	assez abondant	I,9
"80"	"	5,4
"I00"	plus coloré	25,8
l'hydrolyse totale du substrat libèrerait 98 mg. de PO^4H^3.		

(1): mesure de l'activité phosphatasique de I0 cm^3 d'urine.

Nous retrouvons dans cet essai le même phénomène : le précipité obtenu à "62" est plus actif que ceux obtenus à "68" et "80", ce qui peut s'expliquer par une dénaturation par les sels plus poussée de la fraction phosphatasique précipitant vers "62", la fraction précipitant à "I00" étant plus résistante à la dénaturation par les sels.

Afin d'étudier avec davantage de précision la précipitation de la phosphatase dans la zône entre "50" et "70", nous avons repris l'étude de la précipitation avec des concentrations plus rapprochées de sulfate d'ammonium. (tableau VI).

Tableau VI

ACTIVITE PHOSPHATASIQUE DES PRECIPITES OBTENUS PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM DE L'URINE D'HOMME ADDITIONNEE DE SERUM.

Concentration en SO^4Am^2.	PO^4H^3 libéré par hydrolyse en mg.
Essai témoin (1)	4I,I
"50"	2,7
"54"	6,9
"58"	6,6
"62"	6,9
"66"	9,2
"70"	I2,7
"I00"	37,2
l'hydrolyse totale du substrat libèrerait 98 mg. de PO^4H^3.	

(1): mesure de l'activité phosphatasique de I0 cm^3 d'urine.

Dans cet essai, nous retrouvons bien la précipitation progressive entre "50" et "70" sans rencontrer un maximum dans la zône étudiée.

Nous avons attribué cette différence avec l'essai précédent à de légères variations dans les conditions expérimentales; en particulier du pH; de faibles variations de pH imputables aux phosphates urinaires pouvant modifier la précipitation de la phosphatase.

Nous avons étudié à la concentration "70" l'influence de la réaction du milieu sur le relargage de l'enzyme.

Tableau VII

RELARGAGE DE LA PHOSPHATASE URINAIRE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM A DIVERS pH.

Concentration en SO^4Am^3.	pH	PO^4H^3 libéré en mg.
Essai Témoin (1)		3I,4
"70"	5,0	2,5
	5,2	6,6
	5,4	I9,3
	5,6	I8
	5,8	I3,8
	6,0	I3,8
"I00"	5,6	34,5
l'hydrolyse totale du substrat libèrerait 98 mg. de PO^4H^3.		

(1): mesure de l'activité phosphatasique de I0 cm^3 d'urine.

Le pH optimum de relargage, qui est sans doute le point isoélectrique coïncide donc sensiblement avec le pH optimum d'activité (pH 5,2 - 5,6).

Le pH de 5,4 a été adopté dans les essais de précipitation qui vont suivre.

Nous avons étudié comparativement le relargage des phosphatases des urines d'Homme et de Femme, par le sulfate d'ammonium, aux différentes concentrations, en utilisant l'urine additionnée de 2 p.I00 de sérum inactivé, dans les

mêmes conditions que nos essais précédents et en ajustant le mélange à pH 5,4 par addition de SO^4H^2 dilué.

Tableau VIII

RELARGAGE COMPARATIF DES URINES D'HOMME ET DE FEMME (additionnées de sérum) PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

Concentration en SO^4Am^2	Mg. de PO^4H^3 libéré	
	Homme	Femme
Essai témoin (1)	45,5	2I,5
"54"	5,2	2,I
"60"	I2,8	I,4
"66"	I0,4	I,4
"72"	6,9	I,4
"78"	9,7	I,0
"84"	8,3	2,8
"90"	9,2	0,7
"I00"	40,0	I3,8
l'hydrolyse totale du substrat libèrerait 98 mg. de PO^4H^3.		

(1) : activité phosphatasique de I0 cm^3 d'urine.

Dans cette série d'essais, on peut remarquer que la précipitation à partir de "60" est bien plus importante chez l'Homme que chez la Femme; elle constitue chez l'Homme une sorte de palier que l'on ne retrouve pas dans l'urine de Femme en tenant compte du fait que l'urine de Femme a une activité phosphatasique bien plus faible.

Nous avons émis l'hypothèse que la phosphatase relarguée à partir d'un pourcentage de saturation de "60" pouvait provenir directement de la prostate alors que l'enzyme diffusant au niveau du rein n'était relargué qu'aux environs de la saturation.

Afin de vérifier ce fait, nous avons additionné l'urine de Femme de secrétion prostatique (secrétion recueillie au méat urinaire après massage de la prostate); nous avons ajouté 0,05 cm^3 de secrétion à 100 cm^3 d'urine et le relargage a été pratiqué dans les mêmes conditions que précédemment. Nous avons obtenu les résultats suivants.

Tableau IX

RELARGAGE DE L'URINE DE FEMME ADDITIONNEE DE 0,05cm^3 pour 100 cm^3 DE SUC PROSTATIQUE.

Concentration en SO^4Am^2	Mg. de PO^4H^3 libéré
Essai témoin(1)	33,1
"54"	1,4
"60"	3,7
"66"	2,8
"72"	4,1
"78"	2,8
"84"	3,6
"90"	3,7
"100"	13,2
l'hydrolyse totale du substrat libèrerait 98 mg. de PO^4H^3.	

(1): activité phosphatasique de 10 cm^3 d'urine

Cet essai semble confirmer notre hypothèse mais les activités n'étant pas très élevées et les chiffres pouvant prêter à discussion, nous avons réalisé une seconde série d'essais avec de l'urine de Femme additionnée d'une quantité plus importante de suc prostatique : 0,25 cm^3 pour 100 cm^3 d'urine.

Tableau X

RELARGAGE DE L'URINE DE FEMME ADDITIONNEE DE 0,25 cm^3 pour 100 de SUC PROSTATIQUE.

Concentration en SO^4Am^2	Urine brute	Urine + secrétion prostatique
Essai témoin	17,2	89,0
"80"	3,4	27,3
"100"	11,7	18,6
	PO^4H^3 libéré par hydrolyse en mg.	
l 'hydrolyse totale du substrat libèrerait 98 mg. de PO^4H^3.		

Ces résultats semblent confirmer pleinement l'hypothèse que dans l'urine d'Homme la fraction relarguée à partir de la concentration "60" est d'origine prostatique et se trouve mélangée à l'urine au cours de la miction.

HERBERT (55) a déjà montré que la phosphatase prostatique était très fragile et facilement inactivée par l'alcool faible ou la chaleur à 37° à pH 7,4 en présence de sels; ceci nous permet de faire l'hypothèse que l'enzyme prostatique est dénaturé lorsque la concentration en sulfate d'ammonium dépasse 70 pour 100 de la saturation, surtout lorsque le pH s'écarte du pH optimum de la phosphatase. Cette hypothèse parait seule capable d'expliquer le minimum qui existe entre "70" et "100" dans la plupart de nos essais. La concordance avec l'inactivation notable du suc prosta-

tique à la concentration "80", tableau X, plaide en faveur de cette explication.

Par contre la seconde fraction phosphatasique qui est moins sensible à la dénaturation n'est relarguée qu'au voisinage de la saturation; ces deux caractères distinctifs doivent permettre l'étude séparée des deux fractions.

Au cours de ces essais, nous avons multiplié les essais témoins; nous avons vérifié en particulier que le sérum inactivé ajouté à l'urine ne possédait aucune propriété activante pour la phosphatase urinaire, mais il nous a semblé que les protéines du sérum protégeaient la phosphatase contre la dénaturation par les sels, ou par la chaleur à 37° au cours de l'incubation avec les substrats; ce qui explique les résultats plus nets obtenus dans ces conditions.

FRACTIONNEMENT PAR RELARGAGE DE LA PHOSPHATASE URINAIRE.

En possession des données précédemment acquises, nous avons tenté le fractionnement de la phosphatase de l'urine d'Homme de la façon suivante :

TECHNIQUE :

A 10 cm^3 d'urine (additionnée de 2 p. 100 de sérum inactivé) nous ajoutons 30 cm^3 d'eau et 60 cm^3 de solution saturée de sulfate d'ammonium; ainsi la concentration est égale à "60"; nous amenons à pH 5,4 et nous laissons en contact pendant 12 heures. Le précipité est collecté par filtration sur Büchner.

Le filtrat est additionné de la quantité nécessaire de solution de sulfate d'ammonium pour amener à la concentration de "70"; nous laissons en contact 3 heures, puis nous filtrons et nous procédons de même pour avoir les concentrations "80" et "90". Enfin, nous amenons à saturation par addition d'un excès de sulfate d'ammonium pulvérisé et agitation. Chacun des filtres avec le précipité est mis aussitôt en contact avec 10cm^3

de solution M/IO de β glycérophosphate de sodium de pH 5,2; IO cm^3 de tampon acide acétique-acétate de sodium, 30 cm^3 d'eau et I cm^3 de toluène.

Le flacon est alors placé en incubation à 37° pendant 24 heures; les dosages de l'acide phosphorique sont effectués dans les conditions décrites plus haut.

Les résultats sont exprimés dans le tableau suivant :

Tableau XI

ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DES FRACTIONS SEPAREES DE L'URINE D'HOMME PAR RELARGAGES SUCCESSIFS PAR LE SULFATE D'AMMONIUM.

Concentration en SO^4Am^2	Mg. de PO^4H^3 libéré
Essai témoin(1)	38,6
"0 à 60"	I9,3
"60 à 70"	4,I
"70 à 80"	2,8
"80 à 90"	0,I5
"90 à I00"	II,5
l'hydrolyse totale libèrerait 98 mg. de PO^4H^3.	

(1) activité phosphatasique de IO cm^3 d'urine.

Dans cet essai, particulièrement favorable, nous avons donc réussi à séparer nettement deux fractions de la phosphatase de l'urine d'Homme et nous avons retrouvé, en ajoutant les chiffres obtenus pour les diverses fractions, une activité sensiblement identique à celle de l'urine initiale. Les résultats montrent en outre qu'à

partir de la concentration "80" la première fraction de la phosphatase est entièrement précipitée.

Ceci apporte la preuve que dans nos essais précédents, la baisse d'activité pour les concentrations supérieures à "70" est bien due à une dénaturation de l'enzyme.

Dans les essais qui suivent, nous nous sommes donc bornés à étudier l'activité, déterminée selon la même technique, des fractions "80" et "80 à 100".

Tableau XII

ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DES FRACTIONS SEPAREES DE L'URINE D'HOMME PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM.

Concentration en SO^4Am^2	Mg. de PO^4H^3 libéré
Essai témoin(1)	46,2
"0 à 80"	19,3
"80 à 100"	19,3
l'hydrolyse totale libèrerait 98 mg. de PO^4H^3.	

(1): activité phosphatasique de 10 cm^3 d'urine.

Nous retrouvons dans ce cas une activité égale dans chacune des deux fractions étudiées.

Nous avons étudié ensuite comparativement dans les urines d'Homme, de Femme, directement ou après addition de 0,25 p. 100 de sécrétion prostatique, la répartition de la phosphatase dans les deux fractions.

Tableau XIII

ACTIVITES PHOSPHATASIQUES DES FRACTIONS SEPAREES DE DIVERSES PREPARATIONS PAR RELARGAGE AU SULFATE D'AMMONIUM.

Concentration en SO^4Am^2	Homme		Femme		Femme + sécrétion prostat.	
	1er cas	2ème cas	1°) P.	2°) M.	P.	M.
Essai témoin	8I,5	4I,2	20,0	I7,3	85,5	89
"0 à 70"	I4,5	I9,3	0,7	3,4	22,0	27,3
"70 à I00"	33.	I9;3	2,8	II,7	38	I8,6
	PO^4H^3 libéré par hydrolyse en mg.					

Ces essais confirment les précédents et montrent que dans l'urine de Femme normale la fraction précipitée à la concentration "70" est pratiquement nulle, les chiffres obtenus ne dépassant pas les erreurs expérimentales; en effet, il reste toujours dans le filtre essoré une petite quantité de l'urine mise en oeuvre, qui produit une très légère hydrolyse.

L'urine de Femme additionnée de suc prostatique se comporte comme l'urine d'Homme, ce qui permet de supposer que la fraction relarguée de "60 à 80" a une origine prostatique.

DISCUSSION DES RESULTATS :

Le procédé utilisé semble pouvoir permettre de séparer d'une façon assez rigoureuse deux fractions différentes de la phosphatase urinaire, d'origine probablement différente. Ces résultats ouvrent une nouvelle voie de recherche, et l'étude poussée des caractéristiques des deux fractions séparées permettra sans doute de préciser leur origine et éclairera peut-être les rapports de l'enzyme urinaire avec la phosphatase II sérique normale ou dans les cas pathologiques (cancer de la prostate).

Toutefois, le problème demeure complexe car si l'on attribue à une fraction de la phosphatase sérique une origine prostatique, cette fraction ne saurait facilement être distinguée de celle apportée par la secrétion prostatique externe et mélangée à l'urine au moment de la miction.

En tout état de cause, il est probable que le sérum renferme un groupe de phosphatases acides, éliminées par le rein, différentes quant à leur origine (foie, rate, prostate) mais de propriétés très voisines, leur champ d'action pouvant toutefois être légèrement différent.

La méthode décrite ne peut d'ailleurs donner que des résultats indicatifs, en raison de l'inactivation parfois importante, due à la dénaturation par les sels de la phosphatase aux concentrations voisines de la saturation.

En outre, nos essais montrent que la phosphatase urinaire commençant à précipiter à partir de la concentration "60" suit la cristalbumine et montrent la nature albuminique et non globulinique de l'apoenzyme. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de COHN et ses collaborateurs (2I) qui ont trouvé que la phosphatase AI du sérum était précipitée principalement à partir de la fraction "68".

CONCLUSIONS :

I°) Il n'a pas été possible de concentrer la phosphatase urinaire par la méthode des mousses.

2°) L'étude du relargage de la phosphatase urinaire par le sulfate d'ammonium semble indiquer que l'urine d'Homme contient deux phosphatases (ou deux groupes de phosphatases) à caractères distincts :

a) une phosphatase qui est relarguée vers 62 p.IOO de saturation dans l'urine additionnée de sérum inactivé; son activité diminue entre 70 et 90 p.IOO de la saturation; cet enzyme semble

être inactivé par une trop forte salinité du milieu; il est donc fragile comme la phosphatase prostatique. Par ailleurs, il fait pratiquement défaut dans l'urine de Femme. C'est pourquoi nous lui attribuons une origine prostatique. En effet, l'urine de Femme additionnée de suc prostatique se comporte alors comme l'urine d'Homme.

b) une seconde phosphatase qui ne précipite qu'au voisinage de la saturation en sulfate d'ammonium; elle se rencontre dans les urines des sujets des deux sexes. Ce second enzyme parait être d'origine sérique.

CHAPITRE II

ESSAI DE PRECIPITATION DE LA PHOSPHATASE URINAIRE PAR L'ALCOOL.

Nous avons recherché dans ces essais si nous retrouvions les caractéristiques de précipitation mises en évidence par le relargage au sulfate d'ammonium en utilisant l'alcool éthylique comme agent de précipitation.

Comme dans les essais précédents, nous utilisons de l'urine additionnée de 2 p.IOO de sérum inactivé par chauffage à 56° pendant une heure. L'avantage de ce procédé réside en une protection de la phosphatase par les protéines du sérum et en outre l'apparition de précipités appréciables aux diverses concentrations réalisées.

IO cm^3 d'urine amenée à pH 5,4 sont additionnés de 30 cm^3 d'eau et d'alcool à 95° pour compléter le volume à IOO cm^3.

On obtient ainsi un mélange dont le degré alcoolique est voisin de 60°6 à I5°, en tenant compte de la contraction; nous avons désigné dans nos essais par un chiffre entre guillemets la concentration en éthanol pur en volume pour IOO cm^3 à la température de I5° (degré alcoolique réel) dans les mélanges ainsi obtenus.

Les mélanges ont été maintenus à 0° pendant I2 heures. Au bout de ce temps, le précipité formé est recueilli par filtration sur Büchner et essoré; ce précipité est ensuite mis en contact avec 5 cm^3 d'eau et 45 cm^3 de substrat au β glycérophosphate de sodium tamponné à pH 5,2. Le mélange est maintenu en incubation 24 heures à 37°.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant:

Tableau XIV

ACTIVITE PHOSPHATASIQUE DES PRECIPITES OBTENUS PAR L'ETHANOL A PARTIR DE L'URINE D'HOMME (additionnée de sérum).

Concentration en éthanol	PO^4H^3 libéré par hydrolyse en mg.
Essai témoin(1)	64,0
"60"	5,8
"70"	6,9
"79"	I3,I
"87"	22,0
l'hydrolyse totale libèrerait 98 mg. de PO^4H^3.	

(1) activité phosphatasique de IO cm^3 d'urine.

Dans ces conditions, il y a donc bien entrainement d'une partie de la phosphatase avec les protéines floculées par l'éthanol.

Même en opérant à 0°, la dénaturation de la phosphatase par l'éthanol est assez sensible et l'on ne retrouve qu'une petite fraction de l'activité même à la concentration "87".

Nous avons étudié comparativement dans les mêmes conditions l'urine d'Homme et l'urine de Femme aux concentrations "60" "70" "79" "87".

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau XV

ACTIVITES COMPAREES DES PRECIPITES OBTENUS PAR L'ETHANOL A PARTIR DES URINES D'HOMME ET DE FEMME (additionnées de sérum).

Concentration en éthanol	Homme		Femme	
	Ier essai	2ème essai	Ier essai	2ème essai
Essai témoin	37,2	I9,8	23,4	49,0
"60"	I7,6	5,5	II,7	4,4
"70"	I5,I	8,3	I0,8	9,0
"79"	9,7	5,5	I2,4	6,2
"87"	9.4	7,7	I7,2	II,7

l'activité est exprimée en mg. de PO^4H^3 libéré par hydrolyse.

DISCUSSION DES RESULTATS :

Dans ces conditions, nous ne constatons pas de différence importante entre les urines d'Homme et celles de Femme. Nous remarquons un optimum de précipitation entre "60" et "70" où les activités sont plus élevées qu'à "79"; ceci peut d'ailleurs être imputé à une dénaturation plus importante d'une fraction de la phosphatase à cette dernière concentration.

La phosphatase de l'urine d'Homme apparait être un peu plus sensible à la dénaturation par l'alcool que la phosphatase de l'urine de Femme. L'enzyme obtenu à la concentration "87" est dans le cas de la Femme un peu plus actif que tous les échantillons obtenus à des concentrations alcooliques inférieures. Avec le premier échantillon d'urine d'Homme, le précipité obtenu à "87" est moins actif que ceux obtenus aux autres concentrations, l'activité diminuant au fur et à mesure que

la concentration en alcool croit.

Avec la deuxième urine d'Homme étudiée les résultats sont moins significatifs, les fractions obtenues de "60" à "87" présentant des activités phosphatasiques assez voisines.

Il nous a paru intéressant de rapprocher ces résultats des expériences de HERBERT (55), qui a différencié dans le sérum la phosphatase prostatique des phosphatases acides d'une autre origine par sa grande labilité; selon cet auteur, elle serait entièrement inactivée par chauffage pendant I heure à 37° à pH 7,4 en présence de sels, ou par addition de 0,4 volumes d'alcool de pH 4,8 à 7,4 à la température du laboratoire, alors que les autres phosphatases acides du sérum ne sont pas altérées.

Nous pouvons donc admettre que dans nos essais, la phosphatase prostatique a été complètement inactivée à partir de la concentration "70" et que pour les concentrations plus élevées, des fractions de plus en plus importantes de phosphatase d'autre origine précipitent progressivement en suivant les albumines au cours de leur précipitation.

CONCLUSIONS :

La précipitation de la phosphatase urinaire par l'éthanol s'accompagne d'une assez notable perte d'activité qui peut être attribuée à la dénaturation de l'enzyme.

La phosphatase de l'urine d'Homme semble être plus facilement dénaturée, ce qui concorde avec les travaux d'HERBERT sur la fragilité de la phosphatase prostatique en présence d'alcool.

CHAPITRE III

ESSAI DE PRECIPITATION DE LA PHOSPHATASE URINAIRE PAR L'ACETONE.

Nous avons observé au cours des essais précédents la grande sensibilité d'une fraction de la phosphatase urinaire à l'éthanol; nous avons alors essayé de la précipiter par l'acétone.

Dans cet essai, comme dans les précédents, l'urine est additionnée de 2 p. 100 de sérum inactivé.

A 10 cm^3 d'urine, nous avons ajouté les quantités d'eau et d'acétone nécessaires pour réaliser les concentrations suivantes (en acétone) : "20" - "30" - "40" - "50" - "60" - "70" - "90" p. 100 dans un volume total de 100 cm^3. Le mélange est maintenu 12 heures à 0°; au bout de ce temps, le précipité est séparé par filtration et mis en contact avec le substrat au β glycérophosphate de sodium dans les conditions déjà décrites (p.36).

Nous avons étudié comparativement les urines d'Homme et de Femme et les résultats sont exposés dans le tableau XVI.

DISCUSSION DES RESULTATS :

Pour l'urine d'Homme, la précipitation de la phosphatase commence à la concentration "40" et augmente régulièrement jusqu'à un optimum à "80"; toutefois, on ne précipite à cet optimum que 30 p. 100 environ de l'activité initiale.

Pour l'urine de Femme, nous constatons la précipitation à partir de la concentration "60" seulement et l'activité croit jusqu'à "90" où l'on retrouve une activité au moins égale à celle de l'urine initiale.

Ces faits peuvent s'interpréter à la lumière des renseignements déjà obtenus dans les chapitres précédents; ils montrent l'existence dans l'urine de Femme d'une phosphatase peu sensible à la dénaturation et progressivement précipitée avec les albumines; cette phosphatase se

retrouve dans l'urine d'Homme mais elle est accompagnée d'une autre fraction très sensible à l'acétone comme à l'alcool qui précipite plus tôt, mais est inactivée complètement au-dessus de la concentration "80", ce qui explique le maximum d'activité en ce point.

Cette technique, comme celle utilisant l'alcool, ne nous a pas permis de séparer avec netteté les deux fractions comme nous avions pu le faire par relargage au sulfate d'ammonium.

Tableau XVI

ACTIVITES PHOSPHATASIQUE DES PRECIPITES OBTENUS PAR L'ACETONE A PARTIR DES URINES D'HOMME ET DE FEMME (additionnées de sérum).

Concentration en acétone	Mg. de PO^4H^3 hydrolysé	
	Urine d'Homme	Urine de Femme
Essai témoin	89,0	I8,7
"20"	0,3	0
"30"	0,3	0
"40"	2,2	0
"50"	5,5	0,3
"60"	8,3	2,2
"70"	I3,8	8,0
"80"	27,0	I3,8
"90"	24,8	2I,8

l'hydrolyse totale Tibèrerait 98 mg. de PO^4H^3.

CONCLUSIONS :

L'acétone permet d'obtenir des précipités possédant l'activité initiale de l'urine à partir de l'urine de Femme; par contre, avec l'urine d'Homme, on ne retrouve qu'une fraction de l'activité; nous avons attribué ce fait à la dénaturation de l'enzyme d'origine prostatique.

Ces résultats sont plus favorables qu'avec l'alcool car l'activité phosphatasique résiduelle est plus importante, mais ils ne permettent pas la séparation des deux fractions comme nous l'avons obtenue par relargage au sulfate d'ammonium.

CHAPITRE IV

ESSAIS DE CONCENTRATIONS PAR ADSORPTION

P. BIGET (IO) avait utilisé l'acétate de plomb dans le but de purifier la phosphatase urinaire; il espérait éliminer les phosphates et un certain nombre d'impuretés par précipitation à l'état de sels de plomb, selon la méthode de "préadsorption" de KRAUT et PANTSCHENKO-JUREVICZ.

J. COURTOIS a utilisé ce procédé avec de bons résultats pour la purification de la phosphatase A_2 d'amandes. Apliquant cette technique aux phosphatases, BAMANN et SALZER ont éliminé en partie la phosphatase hépatique A_2; la phosphatase A3 isodyname associée demeurant en solution (Cf BIGET (IO).

A l'inverse de ces auteurs qui ont cherché à éliminer les impuretés, nous avons essayé d'obtenir la séparation de la phosphatase par adsorption sélective sur un précipité formé au sein du liquide.

Dans ce but, nous avons utilisé divers réactifs produisant soit avec les constituants de l'urine, soit avec les substances introduites, un précipité naissant, susceptible de fixer par adsorption la phosphatase.

Nous avons ainsi étudié :

I°) Le phosphate de zinc naissant
2°) Le ferrocyanure de zinc et de potassium
3°) Le phosphate de magnésium
4°) Les phosphates monoacide et neutre de calcium
5°) Le phosphate de cadmium tribasique.

I°) ESSAIS AVEC LES SELS DE ZINC.

IOO cm^3 d'urine fraiche sont additionnés de 20 cm^3 de solution d'acétate de zinc à I,2 p.IO Après agitation, il se forme un précipité floconneux qui se dépose lentement.

Après IO minutes, ce précipité est séparé par filtration et remis en suspension dans l'eau distillée. Il est soluble à la faveur du tampon acide acétique-acétate de pH 5,2 dans le substrat que nous utilisons.

Nous avons mesuré l'activité phosphatasique à pH 5,2 de l'urine initiale, du filtrat et enfin du précipité correspondant à IO cm^3 d'urine. Des témoins nous ont permis de connaitre la quantité de phosphore présent dans l'urine dans le filtrat et dans le précipité.

Tableau XVII

FIXATION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE SUR LE PRECIPITE OBTENU AVEC LES SELS DE ZINC.

	PO^4H^3 après hydrolyse	PO^4H^3 initial	PO^4H^3 libéré par hydrolyse
Urine pure IOcm^3	27,5mg.	I2,4mg.	I5,I mg.
Filtrat IO cm^3	8,3 "	.8,6 "	0,3 "
Précipité (correspondant à IO cm^3 urine)	II,5 "	4,8 "	6,6 "

Ces résultats étaient donc encourageants, puisqu'une défécation partielle de l'urine par l'acétate de zinc donnait un précipité conservant une activité phosphatasique notable et que d'autre part, le filtrat était privé d'action phosphatasique.

Toutefois, l'activité phosphatasique du précipité ne représentait qu'une fraction de celle de l'urine initiale; aussi, nous nous sommes demandés si les ions Zn^{++} ne possédaient pas, à cette concentration, une action inhibitrice. Des essais entrepris dans ce sens nous ont montré qu'il en était bien ainsi (voir tableau XVIII page 69).

De nouveaux essais ont confirmé pleinement le fait que la phosphatase était en grande partie adsorbée par le précipité, cependant il en reste toujours des traces dans le filtrat.

D'autre part, le précipité remis en suspension dans l'eau et redissous dans le substrat à pH 5,2 possède une activité approximativement égale à celle de l'urine, additionnée de la même dose de sel de zinc que celle qui se trouve apportée par le précipité. On peut donc dire qu'il n'y a pas d'inactivation appréciable de la phosphatase au cours du traitement mais seulement une inhibition marquée due à la présence des ions Zn^{++}.

Dans le but d'étudier des préparations plus purifiées et de ce fait plus actives de phosphatase, nous avons essayé d'éliminer le zinc par dialyse contre de l'eau distillée.

Au bout de I2 heures, une grande partie du zinc se trouve éliminée, mais nous avons constaté que le liquide dialysé possédait encore une activité plus faible que celle du précipité non dialysé.

	PO^4H^3 hydrolysé
Urine seule (IO cm^3)	23,4 mg.
Urine IO cm^3 + 0,5 cm^3 acétate de zinc	I3,8 "
Solution du précipité (avant dialyse)	22,0 "
Solution du précipité (après dialyse)	I3,8 "

En conclusion, la dialyse, si elle élimine une partie du zinc, inactive par contre l'enzyme.

Il est probable que du zinc reste fixé sur la diastase de façon irréversible.

Ayant remarqué qu'il restait toujours une petite quantité de phosphatase dans le filtrat surmontant le précipité, nous avons entrepris de déterminer qu'elle était la dose de solution d'acétate de zinc nécessaire pour fixer toute la phosphatase présente dans un volume déterminé d'urine.

Nous avons utilisé une solution d'acétate de zinc cristallisé avec 2 molécules d'eau à I3,IO g. pour IOO cm^3.

Dans cet essai, 20 cm^3 d'urine sont additionnés de doses croissantes de la solution de sel de zinc; le mélange est filtré et l'activité phosphatasique résiduelle est déterminée sur une partie aliquote du filtrat correspondant à IO cm^3 d'urine, par notre technique habituelle.

	PO^4H^3 libéré par hydrolyse.
Urine initiale : IO cm^3	36,2 mg.
Filtrat correspondant à IO cm^3 d'urine, après traitement par I p.IOO de solution de sel de zinc	I8,5 "
" par 2 p.IOO "	I4,6 "
" par 3 p.IOO "	0
" par 4 p.IOO "	0
" par 5 p.IOO "	0

Il semble donc que 0,3 cm^3 de solution de sel forme une quantité suffisante de précipité de phosphate de zinc pour adsorber toute la diastase contenue dans IO cm^3 d'une urine à pH voisin de 6,0.

2°) ESSAI D'ADSORPTION SUR LE FERROCYANURE DOUBLE DE ZINC ET DE POTASSIUM.

Poursuivant nos essais, nous avons tenté d'adsorber la phosphatase sur le précipité de ferrocyanure double de zinc et de potassium produit lors de la défécation par la technique de PAGET et DUPONT (74) pour divers liquides biologiques.

Nous avons utilisé les solutions suivantes :

Solution A ($Fe(CN)^6H^4$ 3 OH^2 I7,20
) Eau distillée, q.s.pour IOO cm

Solution B (Acétate de zinc crist. 2 OH^2 I3,IO
) Eau distillée, q.s.pour IOO cm

Expérience

IO cm^3 d'urine amenée à pH 5,0 par addition d'acide acétique dilué sont additionnés de 0,2 cm^3 de solution A puis 0,2 cm^3 de solution B. Le mélange est centrifugé; le liquide clair surnageant le précipité est mis en contact avec IO c de substrat au β glycérophosphate de sodium M/IO de pH 5,2, IO cm^3 de tampon acétique à pH 5,2 et de l'eau distillée, q. s. pour 50 cm^3 d'une part.

D'autre part, le culot de centrifugatio est remis en suspension dans IO cm^3 d'eau et additionné de la même quantité de substrat de tampon et d'eau distillée q.s.pour 50 cm^3.

Les deux préparations sont placées à l'étuve à 37° pendant 24 heures.

Un témoin est effectué pour connaitre la teneur en P minéral de l'urine.

Nous avons obtenu les chiffres suivants

	PO^4H^3 libéré par hydrolyse
Urine initiale	36 mg.
Filtrat	25,2 "
Précipité	2,I "

L'urine ainsi déféquée présente donc une activité presque aussi forte que celle de l'urine non traitée, ce qui montre que dans les conditions où nous avons opéré, il n'y a aucune adsorption de la phosphatase sur le précipité. La faible activité du précipité peut être attribuée au liquide interposé.

Des essais identiques d'adsorption ont été pratiqués à divers pH et avec les mêmes réactifs (pH 5,0 - 5,8 - 7,0 - 8,0 - 9,0); dans aucun cas, nous n'avons observé d' adsorption appréciable de la phosphatase.

Nous aurions pu en conclure que le précipité de ferrocyanure de zinc et de potassium était incapable de fixer par adsorption la diastase. Mais dans l'expérience suivante, nous avons d'abord fixé la phosphatase sur un précipité de phosphate de zinc; ce précipité fut ensuite redissous dans le tampon à pH 5,2 et nous avons pratiqué à nouveau sur ce liquide la défécation au ferrocyanure de zinc comme il est indiqué plus haut.

Nous déterminons l'activité phosphatasique des fractions suivantes :

a) Activité initiale : IO cm^3 d'urine sont mis en contact avec IO cm^3 de tampon acide acétique-acétate de Na N de pH 5,2 et IO cm^3 de solution M/IO de β glycérophosphate de sodium à pH 5,2, eau distillée 20 cm^3.

b) précipité de phosphate de zinc : IO cm^3 sont additionnés de 0,2 cm^3 de solution B; le précipité est séparé par centrifugation; le culot égoutté est redissous dans IO cm^3 de tampon de pH 5,2; nous ajoutons IO cm^3 de solution de β glycérophosphate et 30 cm^3 d'eau.

précipité de ferrocyanure de Zn et K : IO c d'urine sont additionnés de 0,2 cm^3 de solution nous centrifugeons puis rejetons le liquide surn geant; après égouttage le culot est redissous dans IO cm^3 de tampon à pH 5,2; nous ajoutons 0, cm^3 de solution A et centrifugeons.

c) Le liquide surmontant le précipité est décanté, nous lui ajoutons IO cm^3 de solution de glycérophosphate, 30 cm^3 d'eau.

d) Le culot de centrifugation est mis en su pension dans IO cm^3 de tampon de pH 5,2; nous aj tons IO cm^3 de solution de glycérophosphate, e 30 cm^3 d'eau.

Les quatre fractions sont additionnées de I cm^3 de toluène et mises en incubation pendant 24 heures à 37°. Les résultats sont exposés ci-dessous :

Activités phosphatasiques	PO^4H^3 libere par hydrolys
a) Urine initiale	87,5 mg.
b) Précipité de phosphate de zinc	96,6 "
c) Liquide surnageant après élimination de d	47, "
d) Précipité secondaire de ferrocyanure de Zn et K	55,0 "

Ces chiffres montrent que dans un milieu déjà purifié, le ferrocyanure de zinc et po tassium entraine une forte proportion de la phos phatase urinaire, alors que dans un milieu complexe comme l'urine, il n'y a pratiquement aucun adsorption par ce précipité.

C'est d'ailleurs un fait général et maintes fois signalé que les enzymes sont d'auta plus facilement adsorbables qu'ils se trouvent à un stade de purification plus avancé.

3°) ESSAI D'ADSORPTION DE LA PHOSPHATASE SUR LE PHOSPHATE DE MAGNESIUM.

Le principal obstacle à l'utilisation des préparations de diastase, obtenues par adsorption sur un sel de zinc réside dans l'inhibition due aux ions Zn++.

Aussi, nous avons recherché si d'autres précipités possédaient le même pouvoir adsorbant vis à vis de la phosphatase.

Nous nous sommes adressés au phosphate de magnésium qui précipite en milieu de pH suffisamment élevé lorsque l'on ajoute à l'urine une solution d'un sel de magnésium.

Nous avons utilisé une solution M/2 de sulfate de magnésium cristallisé dont nous mélangeons I cm^3 à IO cm^3 d'urine, puis nous alcalinisons par la soude N/I. Il se forme immédiatement un précipité que nous séparons par centrifugation. Ce précipité est remis en solution dans IO cm^3 de solution tampon à pH 5,2.

Son activité est mesurée comparativement à celle du liquide surnageant et à celle de l'urine seule ou additionnée d'une quantité égale de solution de sulfate de magnésium.

Résultats :

	PO^4H^3 libéré par hydrolyse
Urine seule	36,I mg.
Urine additionnée de SO^4Mg	36,9 "
Filtrat	0
Précipité	0

Les ions Mg++ n'ont pas influencé l'activité phosphatasique comme l'avait déjà signalé BIGET (IO); on ne retrouve aucune activité dans le filtrat ou dans le précipité; la diastase a été détruite vraisemblablement par une alcalinité trop forte. En effet, pour obtenir la précipitation du phosphate de magnésium, le pH doit être supérieur à IO,0, ce qui entraine une destruction rapide de la phosphatase.

D'autres essais nous ont montré que l'enzyme était détruit rapidement lorsque le pH est voisin de 9,5.

4°) PHOSPHATE MONOACIDE DE CALCIUM.

Les essais d'adsorption sur le phosphate de magnésium ont été decevants, la diastase étant détruite par l'alcalinité du milieu nécessaire pour assurer la précipitation du phosphate de magnésium; nous avons alors essayé d'adsorber sur le phosphate monoacide de calcium qui précipite dès pH 7,0.

Solutions utilisées :

Solution C (PO_4HNa_2 2 H_2O 1,78 g.
) Eau, q.s. pour 100 cm^3

Solution D (Cl_2Ca, 6 H_2O 2,19 g.
) Eau, q.s. pour 100 cm^3

10 cm^3 d'urine sont additionnés de 1cm^3 de solution C puis de 1,2 cm^3 de solution D. Le précipité est séparé par centrifugation.

Nous étudions son activité comparativement à celle du liquide clair surnageant; ainsi, qu'à celle de l'urine pure ou additionnée des mêmes quantités des solutions C et D.

Résultats :

	PO_4H_3 libéré en mg.
Urine seule	24,0
Urine additionnée des sol.C et D	24,0
Précipité	0
Filtrat	25,4

Il n'y a aucune adsorption de la phosphatase sur le précipité; celle-ci n'est pas altérée et son activité n'est pas influencée par les solutions utilisées.

D'autres essais avec des doses plus élevées de solutions C et D nous ont donné les mêmes résultats. Nous avons également essayé de réaliser la précipitation du phosphate de calcium en milieu alcalin de façon à obtenir la précipitation du phosphate neutre de calcium. Dans ce cas également il n'y a pas adsorption de la phosphatase sur le précipité.

5°) ESSAIS D'ADSORPTION DE LA PHOSPHATASE URINAIRE SUR UN SEL DE CADMIUM INSOLUBLE.

Le seul précipité capable de fixer la phosphatase urinaire que nous ayons rencontré jusqu'ici était le phosphate de zinc; nous avons poursuivi nos investigations par l'étude d'un sel de cadmium, les propriétés chimiques de ce métal étant assez voisines de celles du zinc.

IO cm^3 d'urine sont additionnés de 0,3 cm^3 de solution de chlorure de cadmium à IO p.IOO puis de I cm^3 de solution de CO^3Na^2. Le précipité est séparé par centrifugation. son activité est etudiee comparativement à celles du liquide clair surnageant et de l'urine, soit seule. soit additionnee de la même dose de chlorure de cadmium.

Résultats :

	PO^4H^3 libéré en mg.	
	Ier essai	2ème essai
Urine seule	77	42,2
Urine additionnée de chlorure de cadmium	74	39,2
Précipité	76	32,8
Filtrat	6,5	I8,6

Ces chiffres montrent que le précipité a fixé une quantité importante de diastase; d'autre part, le sel de cadmium n'a réduit que faiblement l'activité phosphatasique de l'urine.

La dose de solution de chlorure de cadmium introduite n'a pas été suffisante pour fixer toute la diastase, puisque le filtrat possède encore une activité phosphatasique appréciable.

Au cours d'essais successifs avec des doses croissantes de solution de chlorure de cadmium, nous avons remarqué qu'il restait toujours une partie de la phosphatase dans le filtrat; cette fraction n'est adsorbée que partiellement par une nouvelle addition de sels de cadmium ou de zinc; elle demeure en majeure partie à l'état de solution dans le filtrat.

Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse émise précédemment de l'hétérogénéité de la phosphatase urinaire.

Dans les essais réalisés avec les urines d'Homme ou de Femme, nous avons observé que dans ces deux types d'urine, une fraction sensiblement équivalente de l'activité phosphatasique n'était pas précipitée. Les pH optima de l'enzyme précipité et de celui demeuré en solution sont identiques (vers pH 5,2). Ceci semble indiquer que la fraction la plus difficilement adsorbable serait celle diffusant au niveau du rein, alors que la phosphatase d'origine prostatique, instable à un pH voisin de 7,0, serait facilement adsorbée sur le précipité. Toutefois, dans ces essais, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence un palier aussi net que celui obtenu par relargage au sulfate d'ammonium.

ETUDE DE L'ACTION INHIBITRICE DES SELS DE ZINC ET DE CADMIUM SUR LA PHOSPHATASE URINAIRE.

Les résultats obtenus nous ont amené à étudier l'influence des ions Zn^{++} et Cd^{++} à diverses concentrations sur la phosphatase.

A 10 cm^3 d'urine, nous avons ajouté des doses croissantes de solution M/10 de sulfate de zinc; 10 cm^3 de solution tampon à pH 5,2, 10 cm^3 de solution M/10 de β glycérophosphate de sodium à pH 5,2 et de l'eau distillée q.s. pour 50 cm^3.

La durée d'hydrolyse a été de 24 heures à 37°.

Des essais identiques ont été effectués avec la même urine et des doses variables de

solution de sulfate de cadmium M/IO aux mêmes concentrations.

Les résultats sont exprimés dans le tableau n° XVIII et la courbe qui suit.

Tableau XVIII

ACTION INHIBITRICE DES SELS DE ZINC ET DE CADMIUM SUR LA PHOSPHATASE URINAIRE.

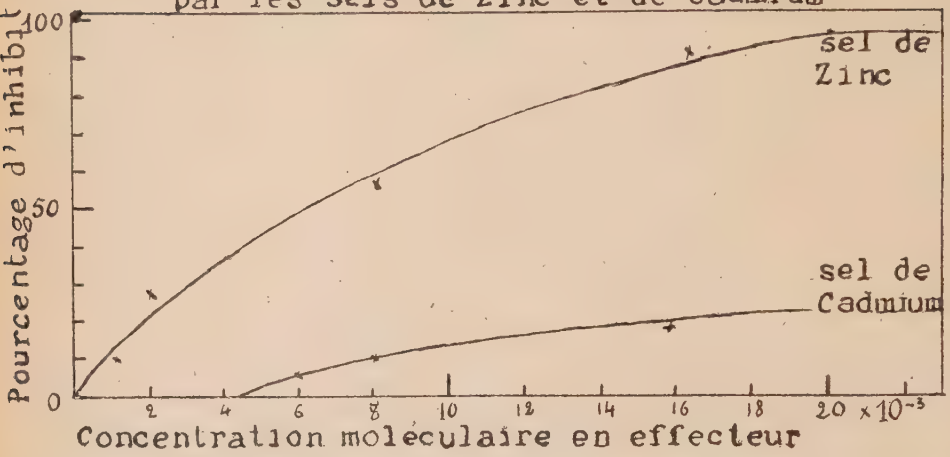
Concentration moléculaire de l'effecteur dans le milieu	Activité en présence de sel de Zn++		Activité en présence de sel de cadmium.	
	mg. de PO^4H^3 hydrolysé	Pourcentage d'inhibition (4)	mg. de PO^4H^3 hydrolysé	Pourcentage d'inhibition
0	I7,9	0	I7,9	0
0,00I	I6,5	7,5	I8,6	0
0,002	I2,4	30,7	I8,6	0
0,004	II,0	38,5	I8,6	0
0,008	8,3	54,8	I5,8	II,5
0,0I6	I3,8	93	I4,5	I9
0,032	0,4	97,7	II,2	37,7

(4): calculé par rapport à l'essai témoin sans effecteur.

L'inhibition par les sels de zinc est beaucoup plus accuentuée que celle due aux sels de cadmium; cette dernière n'apparait qu'à partir de la concentration 0,004 mol. g/l.

COURBE N°I

INHIBITION DE LA PHOSPHATASE URINAIRE
par les sels de Zinc et de Cadmium



Devant ces résultats, nous avons décidé de nous en tenir à l'utilisation des sels de cadmium pour l'obtention de préparations actives de phosphatases extraites de l'urine; le cadmium n'étant que faiblement inhibiteur, il devenait par là même presque inutile de l'éliminer par dialyse. Toutefois, des préparations actives ont été obtenues par dialyse contre un tampon acétique à pH 5,2 ce qui a permis d'obtenir une préparation de phosphatase relativement pure.

RECHERCHE DE LA DOSE NECESSAIRE DE SEL DE CADMIUM POUR ADSORBER TOUTE LA PHOSPHATASE.

Nous avons utilisé pour ces expériences une solution M/10 de sulfate de cadmium (25 g.65 par litre) et une solution M/10 de carbonate de sodium.

20 cm^3 d'urine sont additionnés de doses variant entre 0,5 et 2,5 cm^3 de solution de sel de cadmium et de la quantité de solution de carbonate de sodium nécessaire pour amener l'urine à pH 8,0 soit 2 cm^3, goutte à goutte et en agitant. Il se forme un précipité blanc floconneux qui est séparé par filtration. L'activité résiduelle a été déterminée sur des volumes de filtrat correspondant à 10 cm^3 d'urine, dans les conditions habituelles, c'est-à-dire par mélange avec 10 cm^3 de tampon à pH 5,2 , 10 cm^3 de solution.

de glycérophosphate de sodium M/IO à pH 5,2 et d'eau distillée q.s.pour 50 cm^3; durée d'hydrolyse 48 heures à 37° - les chiffres suivants ont été obtenus :

Tableau XIX

ACTIVITE PHOSPHATASIQUE RESIDUELLE APRES TRAITEMENT PAR LE SULFATE DE CADMIUM.

Dose de SO^4Cd M/IO ajoutée à IO cm^3 d'urine (en cm^3)	Activité du filtrat en mg. de PO^4H^3 hydrolysés
0	60,8
0,5	42,7
I,0	33
I,5	8,0
2,0	4,8
2,5	4,4

La dose de I,5 cm^3 de solution de sulfate de cadmium M/IO s'est montrée pratiquement suffisante pour adsorber la plus grande partie de la phosphatase contenue dans IO cm^3 d'urine. Cependant, comme nous l'avons déjà indiqué plus haut, il reste une petite quantité de phosphatase dans le filtrat, qui n'est pas adsorbée par emploi de doses plus élevées de réactif précipitant.

Nous avons à nouveau essayé de préciser le pH optimum de la fraction phosphatasique demeurant en solution.

Nous avons obtenu les activités suivantes :

pH	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
Mg. de PO^4H^3 hydrolysés	2,2	4,5	1,4	0,8	0,8	0,8

Il semble que la petite quantité de phosphatase restant dans le filtrat présente bien le même pH optimum que celle contenue dans l'urine initiale ou fixée par le précipité.

Nous nous sommes préoccupés de déterminer la composition chimique du précipité se formant dans l'urine alcalinisée par addition de sulfate de cadmium. Le précipité obtenu par l'action d'une quantité connue de SO^4Cd a été recueilli et pesé; l'acide phosphorique a été dosé dans l'urine avant et après la formation du précipité. La quantité de matières organiques adsorbée par le précipité a été évaluée par calcination et le phosphore dosé dans un poids déterminé de précipité.

Analyse

Perte par calcination (matières organiques) : I8,4 p.I00

Précipité minéral : 8I,6 p.I00

Dosage du Phosphore	trouvé	théorie pour $(PO^4)^2Cd^3$
	II,8 p.I00	II,75 p.I00

Les chiffres obtenus après calcination indiquent que le précipité a une teneur en P correspondant à celle du phosphate tribasique de Cadmium $(PO^4)^2Cd^3$. Il ne contient pas de carbonates.

APPLICATION DES OBSERVATIONS ANTERIEURES A L'OBTENTION D'UNE PREPARATION ACTIVE DE PHOSPHATASE.

Nous avons tenté d'obtenir un précipité cadmique ayant une activité enzymatique stable et constante afin de l'utiliser pour nos essais ultérieurs de délimitation du champ d'action de la phosphatase urinaire.

Ce précipité a été préparé en tenant compte des renseignements que nous avions pu tirer des expériences précédentes.

1000 cm^3 d'urine sont additionnés de :

200 cm^3 de solution M/10 de sulfate de cadmium
120 " environ " M/10 carbonate neutre de sodium

La quantité de carbonate de sodium à utiliser est variable selon le pH de l'urine; elle dépend de la proportion des phosphates mono et bimétalliques dans l'urine.

En principe, tout le phosphate de cadmium précipite lorsque le mélange est amené à pH 8,0; il y a intérêt à ne pas dépasser ce pH et à c pérer rapidement à basse température afin de limiter la destruction irréversible de la phosphatase.

Le précipité est recueilli sur Büchner et lavé à deux reprises avec de l'eau distillée, puis désséché sous vide en présence de chlorure de calcium anhydre. L'activité du précipité fraichement recueilli est élevée mais elle tombe rapidement à 0 par dessiccation. Nous avons recommencé plusieurs fois ces essais avec chaque fois les mêmes résultats décevants : au bout de 24 h. le produit sec qui se présente sous forme d'une poudre blanc-crême est presque totalement dépouvu d'activité.

Aussi, pour les essais qui vont suivre, nous avons utilisé une préparation liquide de phosphatase obtenue par adsorption sur phosphate de cadmium dans les conditions fixées ci-dessus, puis redissolution du précipité humide dans la solution tampon acide acétique-acétate de sodium M/2 de pH 5,2, de façon à obtenir un volume total de préparation égal au volume d'urine dont nous étions partis initialement. Le précipité se dissout facilement à pH 5,2. On obtient ainsi une préparation liquide de bonne conservation. Il est à noter que l'activité phosphatasique se conserve beaucoup mieux à ce pH dans un milieu de cette concentration en sel que dans une solution plus diluée ou purifiée par dialyse. La phosphatase présente une grande fragilité à l'action de l'acide acétique dans un milieu non tamponné, elle est détruite rapidement si le pH devient inférieur à 5,0.

La préparation obtenue peut se conserver plus d'un mois (à la température du laboratoire), sans modification importante d'activité, en présence de toluène.

L'avantage de l'emploi de cette préparation est d'opérer dans un milieu toujours identique et débarrassé des sels ou autres constituants de l'urine; cette préparation ne contient en effet qu'une petite quantité de phosphates et de cadmium qui ne modifient pas sensiblement l'activité de la phosphatase.

Au cours de multiples essais avec des préparations liquides contenant du cadmium, nous n'avons jamais pu mettre en évidence une action perturbatrice de cet élément, modifiant les caractéristiques de la phosphatase urinaire.

DISCUSSION DES RESULTATS :

La phosphatase urinaire est adsorbée par les précipités de phosphates de zinc ou cadmium formés dans le milieu. Elle n'est pas adsorbée sur les précipités de phosphates de calcium et magnésium. Il est possible d'envisager une affinité particulière de la phosphatase urinaire pour les ions zinc et cadmium; dans les essais réalisés pour éliminer ces cations dans les préparations actives, nous avons remarqué que la phosphatase suivant les cations Zn^{++} ou Cd^{++}.

Il est curieux de rapprocher cette notion du fait que le zinc a déjà été signalé comme élément constituant et activateur à faibles concentrations pour diverses phosphatases : enzymes des bactéries (PETT et WYNNE (76-77), enzyme du rein, du sérum type I (MASSART et DUFAIT (69), du sérum cancéreux (ROCHE, NGUYEN VAN THOAI, MARCELET, DESRUISSEAUX et DURAND (88).

Il serait certes osé de conclure que les faits mis en évidence indiquent la présence du zinc ou du cadmium dans la constitution de la phosphatase acide urinaire, mais il est peut être possible de considérer, en raison de l'affinité de la diastase pour ces cations, que ceux-ci font partie

des métaux susceptibles d'entrer en combinaison avec le coenzyme et que le zinc et le cadmium sont interchangeables et peuvent jouer le même rôle.

D'autre part, le fait qu'il existe dans l'urine une fraction de la phosphatase non adsorbable dans les conditions décrites plaide en faveur de l'hétérogénéité de l'enzyme urinaire; cette notion confirme les résultats des précédents chapitres; cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence par la technique de l'adsorption deux fractions nettement distinctes dans l'urine d'Homme comme cela avait été possible par le relargage au sulfate d'ammonium.

CONCLUSIONS :

La méthode d'adsorption sélective sur des précipités nous a permis de mettre en évidence la fixation de la phosphatase urinaire sur les précipités de phosphates de zinc et de cadmium, sans altération sensible de l'enzyme. Cette propriété nous a permis d'obtenir des préparations actives et relativement purifiées.

TROISIEME PARTIE

CHAMP D'ACTION ET SPECIFICITE DES PHOSPHATASES ACIDES DE L'URINE ET DU SERUM.

La notion de spécificité domine l'étude des phosphatases; les enzymes isodynames de diverses provenances présentant des affinités variables pour les différents substrats.

Indépendamment de la notion de liaisons phosphoriques plus ou moins riches en énergie, notion introduite récemment en biochimie par LIPMANN (62), certaines phosphatases présentent une nette spécificité, par exemple : l'adenylpyrophosphatase, CORI et PRICE (24); toutefois, il s'agit là d'exceptions et les préparations obtenues, même purifiées, hydrolysent souvent mais avec des vitesses variables les différents esters phosphoriques d'une même structure, et même les différents types de liaisons phosphoriques.

On peut donc jusqu'à ce que de nouvelles recherches viennent éclaircir cette question, considérer les préparations phosphatasiques partiellement purifiées comme un mélange de plusieurs phosphatases spécifiques d'une catégorie de substrats ou mieux d'un type de liaison ester phosphorique; la vitesse d'hydrolyse pouvant être influencée soit par la structure physico-chimique du radical alcoolique ou phénolique lié à l'acide phosphorique, soit encore par l'action inactivante du radical alcoolique ou phénolique libéré dans le milieu sur un enzyme sensible à des composés étrangers au milieu biologique naturel.

Cette conception permet de dersser de chaque préparation phosphatasique une fiche d'identité selon qu'elle hydrolyse avec une vitesse plus ou moins grande les divers substrats.

Cependant, certaines catégories d'enzymes paraissent nettement différenciées; ce sont ceux hydrolysant les diesters de l'acide orthophosphorique et les sels de l'acide inositohexaphosphorique. Toutefois, si la plupart des préparations hydrolysant les diesters sont actives

sur les monoesters, il a été possible de décrire des préparations hydrolysant uniquement les diesters sans dédoubler ensuite les monoesters qui en dérivent. GULLAND et JACKSON (46). Par contre, à notre connaissance, il n'a pas été possible d'obtenir jusqu'ici de préparation active sur les inositohexaphosphates et inactive sur les monoesters. FLEURY et COURTOIS (38); on peut donc considérer les diesterases et les phytophosphatases comme des enzymes distincts dont le coenzyme présente la propriété particulière de se combiner aux diesters ou aux esters de l'inositol pour les dédoubler ensuite.

Dans cette partie de notre travail, nous avons étudié le champ d'action de la phosphatase urinaire sur divers substrats afin de déterminer leurs différentes vitesses d'hydrolyses et de pouvoir comparer la phosphatase urinaire aux divers types de phosphatases déjà connus.

Nous avons ensuite comparé dans des conditions rigoureuses, l'action des phosphatases acides du sérum et de l'urine chez l'Homme et le Porc sur quelques substrats.

La préparation des substrats a été exposée entièrement dans le cas où nous les avons préparés nous-mêmes au laboratoi . Nous avons utilisé les substrats suivants :

MONOESTERS
- I° ACIDE MONOPHENYLPHOSPHORIQUE
- 2° " MONOETHYLPHOSPHORIQUE
- 3° " GLYCOLPHOSPHORIQUE
- 4° " PHOSPHOGLYCOLIQUE
- 5° " ISOPROPYL-PHOSPHORIQUE
- 6° " α GLYCERO-PHOSPHORIQUE
- 7° " β GLYCERO-PHOSPHORIQUE
- 8° " ISOBUTYL -PHOSPHORIQUE
- 9° " NUCLEINIQUE
- IO° " ADENOSINE MONOPHOSPHORIQUE
- II° " INOSITO-HEXAPHOSPHORIQUE

sous forme de sel sodique et de sel calco-magnésien.

DIESTERS
- I° ACIDE DIPHENYLPHOSPHORIQUE
- 2° " DIETHYLPHOSPHORIQUE

CHAPITRE I

PREPARATION DES SUBSTRATS

A) MONOESTERS

I°) MONOPHENYLPHOSPHATE DE SODIUM

Préparation : Nous avons préparé au laboratoire l'acide monophényl-orthophosphorique en faisant réagir l'acide phosphorique déshydraté par chauffage à 250° (acide polyphosphorique) sur le phénol selon la méthode de CHERBULIEZ (I9).

Nous chauffons au bain de sable dans un matras 54 g. d'acide phosphorique $D = 1,6I$, progressivement et maintenons la température à 250° pendant I5 minutes; au bout de ce temps, la perte d'eau par déshydratation correspondant sensiblement à la formation de 37,80 g. d'acide pyrophosphorique.

Nous introduisons l'acide phosphorique déshydraté dans une ampoule de verre avec 20 g. de phénol cristallisé; nous scellons l'ampoule et son contenu est chauffé à l'autoclave pendant 3 heures à I20°.

L'équation de la réaction peut s'écrire

$$P_2O_7H_4 + C_6H_5OH \longrightarrow O = P(OC_6H_5)(OH)(OH) + PO_4H_3$$

Par refroidissement, le contenu de l'ampoule se prend lentement en une masse cristalline que nous dissolvons à froid dans I00 cm^3 d'eau. Nous épuisons cette solution placée dans une ampoule à décantation 6 fois de suite par I00 cm^3 d'oxyde d'éthyle. Les liqueurs éthérées sont réunies puis agitées avec un excès de sulfate de sodium anhydre pour les déshydrater. Nous filtrons puis nous neutralisons exactement par la lessive de soude en présence de phénolphtaléine, en agitant vigoureusement; le phénylphosphate de sodium passe dans la phase liquide plus dense, concentrée qui se sédimente et que l'on sépare par décantation.

Cette fraction diluée avec 100 cm^3 d'eau est acidifiée au tournesol par addition de SO^4H^2 pur puis nous agitons avec 2 g. de charbon adsorbant pour éliminer les petites quantités de phénol qu'elle contient encore. Nous suivons l'élimination du phénol libre par le Réactif des Phénols de Folin et Wu, utilisé selon la technique décrite page 109 sur une petite prise d'essai et nous ajoutons de nouvelles quantités de charbon actif jusqu'à élimination totale du phénol libre.

Nous ajoutons alors une quantité suffisante d'eau de Baryte pour éliminer non seulement l'acide sulfurique ajouté, mais les ions orthophosphates qui précipitent ensuite sous forme de phosphate de baryum. Nous effectuons cette opération en présence de phénolphtaléine qui nous indique la neutralisation complète de l'acide sulfurique puis nous suivons l'élimination des phosphates en effectuant la réaction de Briggs sur une petite prise d'essai du filtrat.

Nous évaporons à sec à la température du laboratoire; le produit désséché est remis en solution dans 20 cm^3 d'eau; la solution est filtrée sur Büchner, puis additionnée d'alcool à 95° pour amener le titre aux environs de 85°.

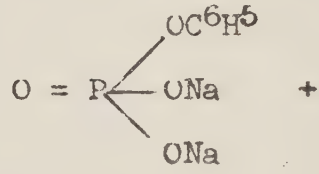
Le phénylphosphate de sodium flocule sous forme d'une masse pâteuse qui se résout à la dessiccation en fins cristaux retenant 5 molécules d'eau; ces cristaux désséchés à l'air perdent lentement 3 molécules d'eau.

Si on opère à un titre alcoolique voisin de 80°, le phénylphosphate cristallise lentement en longues aiguilles avec 2 molécules d'eau. Il est recueilli et séché à l'air, puis analysé. Le rendement a été de 25 p.100 de la théorie.

Analyse :

I°) Phénol libre : nous vérifions que le sel ne renferme pas de Phénol par le réactif des phénols de Folin et Wu (104) selon la technique exposée page 109.

2°) Phosphate de soude : nous vérifions l'absence de phosphate par la réaction de Briggs (I5)



P.M. = 254,I

Titrage :

Ce sel présente comme le phosphate disodique une fonction acide salifiée titrable par ClH N/IO en présence d'hélianthine.

Nous avons titré une prise d'essai de 0,254 g. de sel cristallisé (soit I/IOO° de molécule) en solution dans IO cm^3 d'eau par ClH N/IO en présence d'hélianthine, comparativement avec IO cm^3 de solution M/IO de PO^4Na^2H pur.

Nous avons ensuite dosé le phosphore dans cette solution, après destruction sulfonitrique, par la méthode de Copaux, comparativement avec une solution étalon de PO^4KH^2.

Résultats :

Titrage par ClH N/IO en présence d'hélianthine	PO^4HNa^2 M/IO IO cm^3
0,524 g. Phénylphosphate disodique	IO,04 cm^3

Phosphore total :
théorie pour $C^6H^5PO^4Na^2$, 2 H^2O : I2,20 p.IOO
trouvé : I2,28 p.IOO

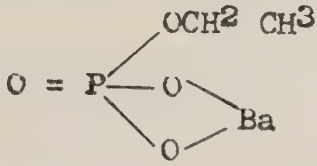
Ces chiffres indiquent, aux erreurs expérimentales près, que le composé obtenu correspond bien à la formule indiquée et qu'il retient 2 molécules d'eau.

La solution M/IO est obtenue par simple dissolution, ce sel étant très soluble.

2°) MONOETHYLPHOSPHATE DE SODIUM

Ce substrat a été obtenu à partir du sel de baryum qui nous a été aimablement fourni par M. A. DESJOBERT que nous remercions ici bien vivement.

Il a été préparé par cet auteur (30) à l'aide de la technique d'O. BAILLY (4) par réaction de l'iodure d'éthyle sur le phosphate trisodique.



; I H^2O

P.M. = 279,4

Nous avons obtenu une solution M/IO en broyant au mortier 2,80 g. du sel de baryum avec 22 cm^3 d'acide sulfurique normal (léger excès). Nous laissons en contact I heure en agitant fréquemment. Nous neutralisons alors par la soude N en présence de rouge de méthyle (virage au jaune); le liquide est chauffé au voisinage de l'ébullition; le SO^4Ba est séparé par centrifugation; le liquide clair décanté est amené à pH 5,2 par quelques gouttes d'acide acétique, puis complété à IOO cm^3 avec l'eau de lavage du précipité.

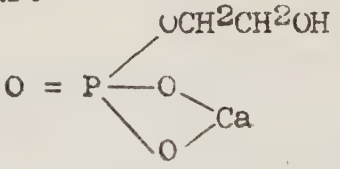
Ce substrat a une concentration M/IO et IO cm^3 doivent contenir à l'analyse 3I mg. de P.; nous l'avons vérifié en plaçant dans un matras de Kjeldahl, 5 cm^3 de substrat, I cm^3 d'acide sulfurique pur, 5 cm^3 d'acide nitrique pur et une perle de verre; (nous relions le matras de Kjeldahl à un aspirateur à boule de Guillaumin); nous chauffons à l'ébullition jusqu'à évaporation de l'eau, puis distillation de l'acide nitrique jusqu'à apparition de légères fumées blanches d'anhydride sulfurique; nous renouvelons 2 fois les affusions de 5 cm^3 d'acide nitrique avec précaution et concentrons de même; après refroidissement, nous transvasons le contenu du matras de Kjeldahl dans une fiole jaugée de 50 cm^3 et complétons avec de l'eau, puis nous dosons l'acide phosphorique selon la méthode de Copaux sur une prise d'essai de 25 cm^3, comparativement avec 5 cm^3 de solution de

phosphate monopotassique pur anhydre à 5,707 g. par litre, contenant la même quantité de SO^4H^2.

En cas de désaccord léger entre le titre du substrat ainsi déterminé et le chiffre théorique, il suffit de prendre une quantité correspondante de substrat pour rétablir la concentration voulue dans les essais.

3°) GLYCOLPHOSPHATE DE SODIUM

Nous sommes partis du sel de calcium recristallisé pur à I molécule d'eau et décrit par P.CARRE (I6) qui nous a été fourni par M. A. DESJOBERT.



I H^2O

P.M.= I98,I

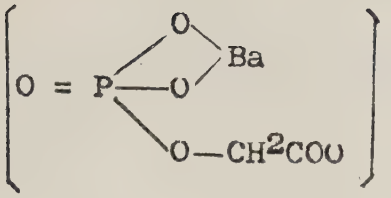
Nous avons éliminé le calcium à l'état de SO^4Ca peu soluble selon la même technique utilisée pour les sels de Ba (voir monoéthylphosphate).

Nous avons évité de pratiquer l'élimination de Ca à l'état d'oxalate de calcium, beaucoup moins soluble, car les oxalates sont inhibiteurs de certaines phosphatases, les petites quantités restant en solution auraient pu perturber complètement nos essais.

Le titre de PO^4H^3 total de la solution a été déterminé après destruction sulfonitrique comme il a été déjà indiqué plus haut.

4°) PHOSPHOGLYCOLATE DE SODIUM

Nous avons utilisé le sel tribarytique à 4 H^2O de l'acide phosphoglycolique, décrit par P. FLEURY et J. COURTOIS (37). Ce corps a été préparé par M. DESJOBERT en condensant le phosphate trisodique à l'acide monochloracétique.

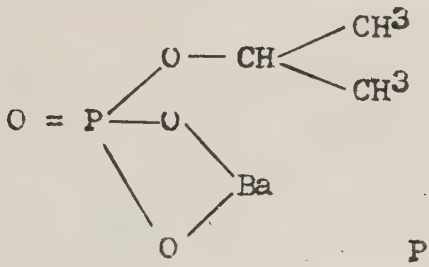


P.M. = 790,2

Une solution M/IO de ce substrat est obtenue en éliminant le baryum par l'acide sulfurique et transformant en sel de sodium, comme il a été indiqué plus haut.

5°) ISOPROPYLPHOSPHATE DE SODIUM

Ce substrat a été préparé à partir du sel de baryum de l'acide isopropylphosphorique obtenu selon la technique de Cavalier (I8).

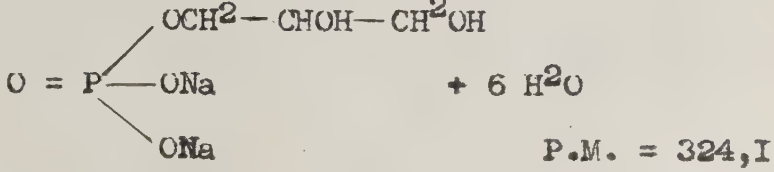


P.M. = 275,4

Une solution M/IO du sel de sodium a été préparée de la façon déjà décrite pour le monoéthylphosphate.

6°) α GLYCEROPHOSPHATE DE SODIUM (a)

Nous avons utilisé le sel pur, cristallisé à 6 OH^2

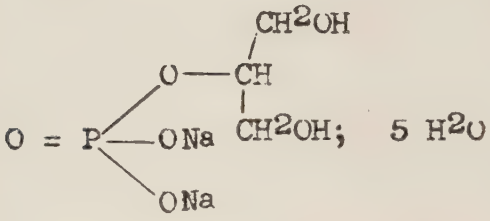


P.M. = 324,I

(a) Nous remercions Mr.O.BAILLY qui nous a obligeamment fourni les échantillons d'α et de β glycérophosphate utilisés

7°) β GLYCEROPHOSPHATE DE SODIUM

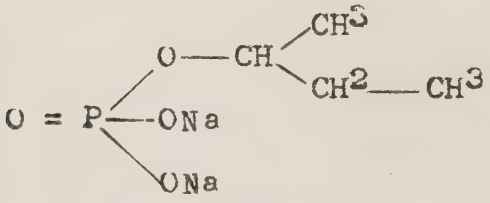
Nous avons utilisé le sel cristallisé à 5 OH^2



P.M. = 306,I

8°) ISOBUTYL-PHOSPHATE DE SODIUM

Nous avons utilisé pour préparer ce substrat le sel de baryum de l'acide mono-isobutylphosphorique obtenu selon la technique de Cavalier (I8).

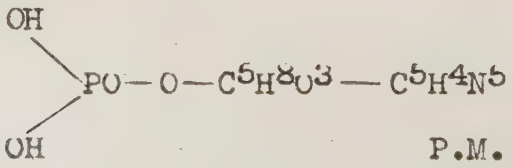


P.M. = 289,45

Nous avons obtenu une solution M/IO de ce substrat en opérant comme il a été indiqué pour le monoéthylphosphate.

9°) ADENOSINE MONOPHOSPHATE DE SODIUM

Ce corps est le sel de sodium d'un nucléotide de l'acide nucléique; il contient une molécule d'adénine et une molécule d'un pentose, le ribose, celui-ci étant estérifié par l'acide phosphorique



P.M. = 347,I

acide phosphorique-ribose-adénine

C'est un isomère de l'acide myoadénylique dont il diffère par la liaison ribose-acide phosphorique qui se trouve en 5 sur ce dernier et en 3 sur l'acide adénylique de levure.

Etant donné la faible quantité de ce substrat en notre possession, nous avons opéré l'hydrolyse à la concentration N/200 sur IO cm^3 de liquide total. Le dosage du phosphore a été opéré par micro-dosage selon la technique de BRIGGS (I5)

IO°) NUCLEINATE DE SODIUM

C'est le sel de sodium de l'acide nucléinique dont la molécule est formée par l'union des quatre nucléotides de l'adenine, de l'uracile de la cytosine et de la guanine. P.LEVENE (6I).

Nous avons utilisé le sel officinal de l'acide nucléinique de levure qui est très soluble dans l'eau; nous avons dosé l'acide phosphorique après destruction sulfonitrique dans une solution à 5 g. pour IOO cm^3 de ce sel et nous avons préparé une solution M/IO en effectuant la dilution nécessaire. Il renfermait 8,32 p.IOO de P organique et 0,3 p.IOO de P minéral.

Il est à noter pour ce substrat que le dosage terminal par la méthode de Copaux doit être précédé de deux précipitations successives du phosphate ammoniaco-magnésien pour se débarrasser de l'acide nucléinique.

II°) INOSITOHEXAPHOSPHATE DE SODIUM

Nous sommes partis du sel de sodium préparé suivant la technique de Posternak (78), à partir du sel de calcium et magnésium du commerce. Il est soluble dans l'eau et correspond selon cet auteur à la formule :

$$C^6H^{12}O^{27}P^6Na^{12} + 35\ H^2O \qquad P.M. = 1608,6$$

Nous avons préparé un substrat M/IO en PO^4H^3 estérifié en dissolvant I/60° de la molécule par litre d'eau et en vérifiant la teneur en phosphore par dosage après destruction sulfonitrique.

INOSITOHEXAPHOSPHATE DE CALCIUM ET MAGNESIUM

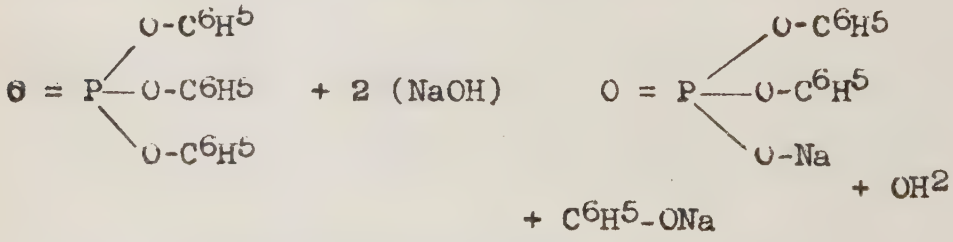
Nous avons utilisé le sel du commerce (Phytine Ciba). Nous avons pratiqué le dosage du phosphore après destruction sulfonitrique sur une solution à 5 p. IOO et nous avons préparé une solution M/IO en effectuant la dilution nécessaire.

L'hydrolyse de ce substrat étant infime en 24 heures, nous avons prolongé le contact pendant 7 jours.

B) DIESTERS

I°) DIPHENYLPHOSPHATE DE SODIUM

Nous avons préparé au laboratoire par une technique simple et pratique l'acide diphénylphosphorique pur en saponifiant le triphénylphosphate par la soude 2 N à l'ébullition (a)



Nous avons placé dans un ballon :

(Triphénylphosphate	32,60 g.
) Soude caustique en pastilles	8,0 "
(Eau	IOO cm^3

(a) Le triphénylphosphate est un produit commercial facile à purifier par cristallisation dans le chloroforme.

Nous relions le ballon a un réfrigérant à reflux et nous portons à l'ébullition jusqu'à dissolution des globules de triphénylphosphate, ce qui demande 4 à 5 heures. Après refroidissement nous neutralisons exactement par SO^4H^2 pur au papier de tournesol. La solution est placée dans un cristallisoir en Pyrex et évaporée à sec; ensuite nous plaçons le cristallisoir dans une étuve à 80° où il est maintenu jusqu'à disparition de toute odeur de phénol (36 heures environ).

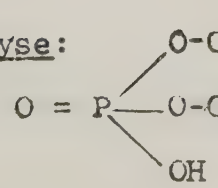
Le produit est dissous dans 200 cm^3 d'eau; nous acidifions par 50 cm^3 d'acide sulfurique N, puis nous ajoutons 2 g. de charbon adsorbant pulvérisé et nous laissons en contact I/4 d'heure en agitant, puis nous filtrons sur Büchner. Ce traitement a pour but d'éliminer toute trace de phénol libre ainsi que les produits d'oxydation du phénol ayant pu se former au cours du chauffage.

Nous ajoutons au filtrat 5 cm^3 de SO^4H^2 pur et nous plaçons le liquide dans une ampoule à décanter; nous épuisons par 50 cm^3 d'oxyde d'éthyle en agitant vigoureusement pendant 3 minutes; l'éther est décanté et nous épuisons à nouveau dans les mêmes conditions 5 fois de suite avec 20 cm^3 d'éther.

L'éther est évaporé; nous obtenons un produit incolore huileux qui cristallise facilement en aiguilles rayonnées. Ce produit est déjà très pur et son analyse donne les chiffres correspondant à la théorie pour l'acide diphénylphosphorique. Nous l'avons purifié par recristallisation après dissolution dans l'eau bouillante (soluble dans 33 parties d'eau à 20°); il cristallise en prismes quadrangulaires biobliques (système triclinique) avec 2 molécules d'eau. Le rendement a été de 92 p.100 de la théorie.

Point de fusion du corps anhydre :65° au bloc Maquenne

Analyse:



$O = P(-O-C_6H_5)(-O-C_6H_5)(-OH)$, 2 H^2O P.M. = 286,13

L'acide diphénylphosphorique possédant la fonction acide la plus forte de l'acide phosphorique, il consomme donc sensiblement la même quantité d'alcali pour sa neutralisation en présence de phtaléine qu'en présence d'hélianthine.

Nous avons fait ce titrage comparativement avec une solution d'acide sulfurique de titre connu et de même dilution.

Les résultats obtenus indiquent que notre corps ne contient pas d'acide monophényl-orthophosphorique qui possède une première fonction acide titrable en présence d'hélianthine et une seconde titrable en présence de phtaléine.

Nous avons dosé le phosphore sur une prise d'essai, après destruction sulfonitrique, par la méthode de Copaux, comparativement avec une solution de PO^4H^2K de titre connu.

Titrage par NaOH N/10	Acide sulfurique N/10 : 10 cm^3	Acide diphénylphosphorique anhydre 0,250 g.en 10cm^3
à l'hélianthine	10,01	10,00
à la phtaléine	10,05	10,05

Phosphore total : théorie : 12,40 p.100
trouvé : 12,375 p.100

Le corps obtenu ne renferme ni phénol, ni acide orthophosphorique libres.

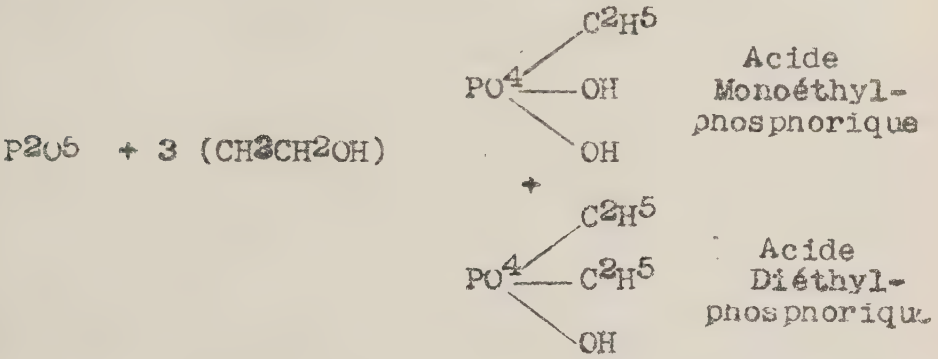
Nous avons préparé une solution M/10 de ce substrat en dissolvant 0,286 g. d'acide cristallisé à 2 H^2O dans 10 cm^3 de soude N, ajustant à pH 7,0 et amenant à 100 cm^3.

L'acide diphénylphosphorique étant un acide fort, le pouvoir tampon du sel est négligeable et il est inutile d'ajuster la solution aux pH auxquels doivent s'effectuer les essais;

par contre, comme nous l'indiquons par la suite (p.II2), l'hydrolyse de la deuxième liaison ester acidifie le milieu et cette hydrolyse diastasique doit être réalisée en milieu fortement tamponné.

2°) DIETHYLPHOSPHATE DE SODIUM

Nous avons préparé ce sel au laboratoire par la technique de Cavalier (I7) qui fait intervenir la réaction théorique suivante :



Nous avons mis en contact un mélange de 20 g. d'alcool absolu, 20 g. d'oxyde d'éthyle anhydre, refroidi dans la glace, avec 20 g. d'anhydride phosphorique ajouté par petites portions celui-ci se dissout avec un bruissement caractéristique.

Nous laissons en présence pendant I2 heures et la réaction se continue lentement.

Le liquide est dilué avec I00 cm^3 d'eau et neutralisé d'abord par le carbonate de baryum, puis par la baryte caustique en présence de phénolphtaléine en tiédissant vers 50°. Après filtration, il se dépose par refroidissement le mono - éthylphosphate de baryum que l'on purifie par recristallisation; ce sel présentant un maximum de solubilité vers 50°, il se dépose en lames hexagonales aplaties avec 6 molécules d'eau.

Après refroidissement, les eaux mères renferment le diéthylphosphate de baryum qui est très soluble; nous nous sommes aperçus que la

solution contenait encore une quantité importante de monoéthyl-phosphate.

Nous avons éliminé ce sel par addition ménagée d'une solution à IO p.IOO d'azotate de plomb, jusqu'à ce qu'une nouvelle addition ne produise plus de précipité. La solution est refroidie à la glacière, puis filtrée.

L'excès de plomb introduit a été éliminé par H^2S.

La solution a été concentrée jusqu'à cristallisation du diéthylphosphate qui apparait en lamelles.

Ce sel est purifié par dissolution dans l'alcool chaud, d'où il cristallise par refroidissement en lamelles prismatiques anhydres.

Le phosphore a été dosé dans une solution M/IO de ce substrat, après destruction sulfonitrique par la méthode de Copaux et le baryum à l'état de sulfate.

Nous avons trouvé les chiffres suivants :

	trouvé	théorie
phosphore	7,4I	6,98 p. IOO
baryum	32,67	30,95 p. IOO

Nous avons obtenu une solution M/IO de ce substrat en éliminant le baryum à l'état de sulfate comme il a été indiqué pour le monoéthylphosphate.

Le substrat obtenu n'étant pas absolument pur, nous avons utilisé le dosage de l'alcool, conjointement au dosage de l'acide phosphorique dans les produits d'hydrolyse, pour apprécier avec certitude l'hydrolyse de ce diester.

Nous avons opéré sur la totalité du mélange ayant été mis en incubation; nous le neutralisons avec de la soude en présence de phénolphtaléine et nous distillons lentement dans un appareil en verre jusqu'à recueillir 30 cm^3.

Le distillat est acidifié légèrement par SO^4H^2 et nous le distillons de nouveau jusqu'à recueillir 20 cm^3 dans une fiole jaugée.

Nous avons effectué le dosage de l'alcool par oxydation nitro-chromique (CORDEBARD (23) l'alcool est oxydé en acide acétique par une solution de bichromate de potassium dans l'acide nitrique; le titrage iodométrique permet de connaitre le bichromate consommé (technique de Postic COURTOIS et RABATE (79).

Le dosage de l'acide phosphorique est effectué sur le résidu de la première distillation; le liquide restant dans le ballon est ramené au volume primitif, additionné de 20 cm^3 de mixture magnésienne puis de 10 cm^3 d'ammoniaque, pour obtenir la séparation à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien. Le dosage est terminé ensuite selon la technique habituelle (page I3).

Nous avons pu ainsi calculer la quantité d'alcool correspondant à l'hydrolyse du monoester et en déduisant ce chiffre de l'alcool total, apprécier l'hydrolyse diester.

Au bout de 24 heures d'incubation, les chiffres obtenus étaient très faibles et ne dépassaient pas la marge d'erreurs expérimentales; nous avons prolongé l'hydrolyse pendant 7 jours ce qui nous a montré une hydrolyse faible, mais nette du diéthylphosphate.

CHAPITRE II

ETUDE DE L'HYDROLYSE DES DIFFERENTS SUBSTRATS PAR LA PHOSPHATASE URINAIRE.

Nous avons opéré à pH 5,2; BIGET (IO) avait observé que la phosphatase urinaire avait un pH optimum voisin de 5,2, nous l'avons d'ailleurs vérifié à diverses reprises. Pour le sérum nous avons trouvé un optimum pour la phosphatase acide entre pH 5,0 et 5,5. Nous avons utilisé le système tampon acide acétique-acétate de sodium de pH 5,2.

D'une façon générale, afin d'obtenir des chiffres comparables nous avons opéré dans les conditions suivantes de concentration :

a) CONCENTRATION EN SUBSTRAT = M/50 en tenant compte du nombre de molécules de PO^4H^3 libérables par hydrolyse d'une molécule de substrat : ex.: pour l'inositohexaphosphate, nous avons pris M/300 comme base de calcul, c'est-à-dire M/50 en acide phosphorique estérifié.

b) CONCENTRATION EN TAMPON M/5 en acide acétique:

Dans tous les cas. nous avons évité de dépasser un pourcentage de 50 p.IOO d'hydrolyse pour limiter le ralentissement de la vitesse initiale par l'action inhibitrice des phosphates et la diminution de la concentration en substrat.

Nous avons utilisé une préparation phosphatasique obtenue par adsorption de l'enzyme sur le phosphate de cadmium et redissolution de ce précipité dans le tampon acétique N/2, comme cela été indiqué page 73.

Nous avons mis en contact :

Phosphatase urinaire	5 cm³
Tampon à pH 5,2	IO "
Substrat solution M/IO	IO "
Eau, q.s.pour	50 "
Toluène	I "

Nous avons placé à l'étuve à 37° en général 24 heures mais parfois 7 jours dans le cas de substrats lentement hydrolysés.

Le dosage de l'acide phosphorique a été pratiqué ensuite, après précipitation à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien, par la méthode de Copaux.

Les résultats sont exposés dans le tableau XX. Nous avons réalisé des essais témoins sans enzyme dans les mêmes conditions de pH et de température, afin de tenir compte de l'hydrolyse spontanée (généralement minime) de chacun des substrats en milieu acide.

Tableau XX.

HYDROLYSE DES DIFFERENTS SUBSTRATS PAR LA PHOSPHATASE URINAIRE DE L'HOMME

	Pourcentage d'hydrolyse	
	24 H.	7 jours
1° MONOPHENYLPHOSPHATE	100	
2° MONOETHYLPHOSPHATE	19,2	
3° GLYCOLPHOSPHATE	9,1	
4° PHOSPHOGLYCOLATE	1,4	5,3
5° α GLYCEROPHOSPHATE	24,7	
6° β GLYCEROPHOSPHATE	40,5	
7° ISOPROPYLPHOSPHATE	7,25	
8° ISOBUTYLPHOSPHATE	28,5	
9° NUCLEINATE DE Na	7	
10° DIPHENYLPHOSPHATE de Na	2	
11° DIETHYLPHOSPHATE de Na	0,9	5,8
12° INOSITOHEXAPHOSPHATE de Na	0	0,8
13° d° de Ca et Mg.	0	

pour le Diphénylphosphate, le résultat correspond au PO^4H^3 estérifié libéré.

DISCUSSION DES RESULTATS :

L'examen des chiffres ci-dessus montre que le substrat qui est le plus rapidement hydrolysé par la phosphatase urinaire est le monophénylphosphate et que sa vitesse d'hydrolyse est environ 2,5 fois supérieure à celle du β glycérophosphate.

Le β glycérophosphate est hydrolysé sensiblement plus vite que son isomère α .

L'α glycérophosphate est un peu plus rapidement hydrolysé que l'éthylphosphate et celui ci plus que le glycolphosphate. Par contre, le phosphoglycolate n'est attaqué que de façon infime même au bout de 7 jours d'hydrolyse. Ce substrat est hydrolysé rapidement par la phosphatase II de la graine de Moutarde blanche. COURTOIS (26).

J. COURTOIS nous a obligeamment signalé qu'au cours de recherches non publiées il avait observé que la phosphatase du son de blé hydrolysait l'acide phosphoglycolique plus rapidement que l'acide β glycérophosphorique, l'acide glycol phosphorique et l'acide nucléinique.

L'isobutylphosphate est beaucoup plus rapidement attaqué que l'isopropylphosphate et cette différence ne semble explicable que par une spécificité propre à l'enzyme urinaire.

Les diesters ne sont attaqués que d'une façon à peine appréciable en 24 h. mais nette au bout de 7 jours. Les esters de l'inositol ne sont pas sensiblement hydrolysés par la phosphatase urinaire comme l'avaient déjà signalé COURTOIS et BIGET (27).

Le nucléinate de sodium est hydrolysé d'une façon appréciable, beaucoup plus que les diesters. Si ce corps présente la structure généralement admise où les quatre molécules du tétranucléotide sont deux fois estérifiés, le fait qu'il soit plus rapidement hydrolyse que les diesters semblerait indiquer dans l'urine la présence de ribonucléase, qui, libérant les mononucléotides

permettrait leur déphosphorylation par la monoestérase.

Afin de confirmer ces premiers résultats, nous avons étudié à plusieurs reprises l'action comparée des phosphatases urinaires d'Homme et de Porc sur certains de ces substrats.

Les résultats sont exposés dans le tableau n° XXI. (page 96)

Ces résultats confirment ceux déjà exposés et montrent la similitude d'action entre les phosphatases urinaires de l'Homme et du Porc, l'urine de cet animal étant beaucoup moins active que celle de l'Homme. Toutefois, chez le Porc, l'écart entre les vitesses d'hydrolyse des acides α et β glycérophosphoriques est plus accentué que chez l'Homme.

Parmi les monoesters étudiés, l'acide phosphoglycolique est toujours le plus lentement hydrolysé par tous les échantillons.

Enfin, aussi bien chez l'Homme que chez le Porc, certains des échantillons ont dédoublé d'une façon non négligeable les acides diphénylphosphorique et inositohexaphosphorique. Ces hydrolyses ont toujours été notablement inférieures à celles observées avec les monoesters de composés acycliques (à l'exception peut être de l'acide phosphoglycolique).

Tableau XXI

ACTION DES PHOSPHATASES URINAIRES DE L'HOMME et du PORC SUR DIVERS ESTERS PHOSPHORIQUES

	Durée de l'hydrolyse en heures	Monophényl phosphate	α Glycéro phosphate	β Glycéro phosphate	Monoéthyl-phosphate	Glycol phosphate	Phospho glycolate	Diphényl phosphate	Inositohexa-phosphate
HOMME									
n° I	24		I35	297	I22	II4	4	8	0
n° 2	48		357	490	345	305	39	I7	8
n° 3	48		255	364	-	204	I5,7	0	I8
n° 4	48		I57	249	84,6	92,5	22,7	I8,3	I,3
n° 5	24	630	I55	255					
PORC									
n° I	24		8,7	74	I3,I	4	4	0	0
n° 2	96		6I	I48	6I	48	I7	I7	8
n° 3	I40		45	I29	I2	28	II	3,5	I7,4
n° 4	I52		94,5	I66	50,6	34	24,4	22,7	3

Les résultats sont exprimés en mg. de P libéré par hydrolyse sous forme d'acide orthophosphorique rapporté à

CHAPITRE III

ETUDE COMPAREE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE DE L'URINE ET DU SERUM D'HOMME ET DE PORC SUR LES DIVERS SUBSTRATS.

Afin de comparer dans les mêmes conditions l'action des phosphatases de l'urine et du sérum sur les divers substrats, et de mettre en évidence avec davantage de certitude l'hydrolyse des substrats les plus difficilement dédoublés, pour lesquels les chiffres trouvés ne dépassaient guère la somme des erreurs expérimentales, nous avons repris nos essais avec une technique plus précise.

Nous nous sommes rendus compte de la nécessité d'opérer d'une façon différente de celle adoptée dans le cas où nous voulions simplement mesurer l'activité phosphatasique (première partie).

En effet, l'activité de la phosphatase peut se manifester au dépens de composés phosphorés contenus dans le sang principalement, par exemple, les hexosephosphates intervenant au cours du processus de la glycolyse, et même préférentiellement au substrat introduit dans le milieu.

C'est un fait bien connu que le taux du PO^4H^3 s'accroit lentement dans le sérum à partir du moment du prélèvement, même à la température du laboratoire. (Ce qui implique d'ailleurs la nécessité d'effectuer la défécation en vue du dosage du phosphore minéral aussitôt après le prélèvement.)

Dans le cas de simple mesure de l'activité phosphatasique (voir première partie)il importe peu que cette activité s'exerce au dépens du substrat introduit ou de substrats naturellement présents dans le sérum, mais dans le cas présent, où nous nous proposions de comparer les vitesses d'hydrolyse ou même de rechercher s'il y a effectivement hydrolyse de certains substrats, nous pouvions craindre que les petites quantités d'acide phosphorique libérées par la phosphatase ne l'aient été aux dépens de composés phos-

phorés du sérum plus facilement attaquables par l'enzyme.

Ces considérations nous ont amené à concevoir une technique plus rigoureuse et plus précise comportant deux tubes témoins pour chaque dosage. l'un contenant le substrat, l'autre le sérum placés dans les mêmes conditions de pH, de dilution et de température que le tube utilisé pour le dosage.

Ces tubes témoins sont mélangés exactement au moment de la défécation et le tube du dosage est dilué dans les mêmes proportions de façon que le dosage de l'acide phosphorique par la méthode de BRIGGS soit pratiqué exactement dans les mêmes conditions de concentration et donne des colorations comparables.

La différence entre le tube de dosage et le tube témoin est dans ces conditions exclusivement due à l'hydrolyse par la phosphatase du substrat considéré.

Note : Les petites erreurs de mesure dues aux pipettes sont évitées en utilisant les mêmes pipettes pour les tubes de dosage et le témoin; il ne reste plus en cause que les légères erreurs de mesure imputables à l'opérateur qui peuvent être très réduites si l'on opère avec soin. On arrive ainsi à une grande précision dans la mesure de l'acide phosphorique libéré; erreur totale sur le dosage $< 0{,}1\ \gamma$ de P.

Technique :

Dans des tubes à essais stériles, nous mesurons avec précision :

	Tube Dosage	Tubes Témoins A	Tubes Témoins B
Substrat N/10 pH 5,2	2 cm³	2 cm³	0
Tampon N/I de pH 5,2	I "	I "	I cm³
Eau distillée	6 "	7 "	8 "
Sérum	I "	0	I "
Toluène	X gouttes	Xgout.	X gout.

Les trois tubes sont munis de bouchons de caoutchouc stérilisés et sont placés pendant 24 heures à 37°.

Au sortir du thermostat, nous mélangeons sans perte les tubes témoins A et B et nous ajoutons 4 cm^3 de solution d'acide trichloracétique à 25 g. pour 100 cm^3.

Dans le tube Dosage, nous mesurons 10 cm^3 de tampon à pH 5,2 dilué au dixième, puis 4 cm^3 d'acide trichloracétique.

Nous agitons puis nous filtrons les deux mélanges au bout d'un quart d'heure sur filtres à analyse et nous dosons l'acide phosphorique par la méthode de Briggs, selon la technique exposée plus haut (1ère partie), mais en effectuant le dosage colorimetrique sur 12 cm^3 de filtrat et des doses doubles de réactifs de celles indiquées (ceci uniquement dans le cas de dosage au colorimètre de Duboscq).

La mesure colorimétrique est faite au photomètre étalonné ou à défaut au colorimètre de Duboscq comparativement avec un tube standard contenant 50 microgrammes de phosphore, sous forme d'acide phosphorique, pour un volume total de 20 cm^3, préparé dans les mêmes conditions que les tubes de dosage.

Nous avons étudié, selon cette technique, l'activité sur les différents substrats de préparations diastasiques d'origines différentes:

a) Sérum d'Homme
b) " de Porc
c) Urine d'Homme
d) " de Porc
e) Phosphatase urinaire humaine purifiée (obtenue selon la technique exposée page 73).
f) Sperme
g) Macération de prostate humaine (obtenue selon la technique détaillée exposée page 32).
h) Macération de prostate de Porc.

Les résultats de ces essais sont exposés dans le tableau XXII.

Tableau XXII

HYDROLYSE COMPAREE DE DIVERS SUBSTRATS
PAR LES PHOSPHATASES ACIDES DE DIFFERENTES ORIGINES

Nature de la Préparation Phosphatasique	Durée de l'hydrolyse	Monophényl-phosphate	α Glycéro phosphate	β Glycéro phosphate	Ethyl phosphate	Glycol phosphate	Phospho glycolate	Adénosine monophosphate	Nucléinate	Diphényl phosphate	Inositohexa-phosphate
SERUM HUMAIN	H.										
I°) Mélangé	48		2,55	7,58	2,I5	2,65	2,I			8,5	C
2°)	24		3,20	5,27	2,I9	3,65		5,8I		2,59	
2° bis	24			4,I7			I,45		5,04	3,76	2,77
3°)	24		I,03	2,3I					I,09	I,04	
4°)	24		3,07	4,4I						I,45	C,75
5°)	24		C,88	3,87						I,32	0,45
6°)	24	4,5I		2,32							
SERUM DE PORC											
I°)	48		3,64	I0,0		I,6	I,4			4,6	0
2°)	24		3,65	I6;I8	6,57	5,8	3,2			I2,78	0,4
3°)	36		I0,84	I7,3						I4,08	
4°)	24		I0,68	I2,94	6,65	8,38		I5,48		I3,35	
4 bis	24			8			I,I		6,I8	I0,65	2,I8
5°)	24		4,25	6,88						4,40	0,05
6°)	24	I35,6		24,85							

URINE D'HOMME diluée au I/50e	24		I0,85	I3,I2						0,59	0,43
moyenne3essais	24									0,40	0,38
essai par dif.	24									I,3	
PHOSPHATASE URINAIRE HUMAINE diluée au I/20e	24		3,II	9,06						0,42	0,29
SPERME HUMAIN dilué I/400e	24		I07,8	I66,4						22,08	0,08
URINE DE PORC non diluée	24		0,84	3,40						0,29	0
PROSTATE HOMME (I)	24		II35	I885						36	0
PROSTATE PORC (I)	24		7,07	II,05						I	0

(I) activité rapportée à I g. de tissu frais

Les chiffres représentent le phosphore (en mg.) libéré sous forme d'acide orthophosphorique, à partir des substrats, et rapportés à I00 cm^3 de préparation. Pour les diesters, les chiffres représentent l'acide phosphorique libéré par hydrolyse totale (exprimé en P).

Tableau XXIII

ACTIVITES COMPAREES DE DIVERSES PREPARATIONS ENZYMATIQUES SUR LE GLYCEROPHOSPHATE ET LE DIPHENYLPHOSPHATE EN MILIEU ACIDE (pH 5,2) - Tampon acide acétique-acétate de sodium.

	Glycérophosph % d'hydrolyse en 24 heures	Diphénylphosph % de P total libéré en 24 H.	Rapport des pourcentages d'hydrol. Diphénylphosph. / Glycérophosph.
a) Sérum Humain (moyenne de 6 essais)	0,74	0,5I	0,69
b) Urine Humaine (diluée au I/20°)	2,02	0,I3	0,058
c) Sérum de Porc (moyenne de 8 essais)	2,39	I,47	0,6I
d) Urine de Porc (diluée au I/20°)	I,80	0,22	0,I2
e) Macération au I/I00° de Prostate humaine			
a) diluée I/20°	40,	0,85	0,02
b) diluée I/50°	6,08	0,II	0,02
f) Sperme Humain (dilué au I/I00°)	6,7	0,89	0,I3
g) Macération I/I00° de Prostate de Porc	I,78	0,I6	0,09

DISCUSSION DES RESULTATS :

Le substrat le plus rapidement hydrolysé par les sérums d'Homme et de Porc est, comme pour les urines, le monophénylphosphate.

Dans toutes les préparations, le β glycérophosphate est attaqué plus rapidement que l'isomère α . L'écart est un peu plus accentué dans le sérum de Porc que dans celui de l'Homme. Nous avions pu faire une remarque semblable au sujet de leurs urines.

Dans le sérum le glycolphosphate est hydrolysé sensiblement avec la même vitesse que l'éthylphosphate, alors que dans l'urine (tab.XX) le glycolphosphate est hydrolysé avec une vitesse deux fois moindre.

Le phosphoglycolate est hydrolysé de façon appréciable par le sérum d'Homme ou de Porc alors qu'il ne l'est que très lentement par la phosphatase urinaire.

Dans les deux essais avec l'adénosine monophosphate et les sérums d'Homme et de Porc, ce substrat est hydrolysé rapidement, plus rapidement même que le β glycérophosphate, bien que nous ayons utilisé une concentration 4 fois plus faible (M/200).

Le nucléinate est également facilement hydrolysé par le sérum, d'une façon beaucoup plus importante que par l'urine.

Nous signalerons aussi que l'activité phytasique des prostates d'Homme et de Porc et du sperme est nulle. Par rapport à l'activité sur le β glycérophosphate, l'activité phytasique des sérums d'Homme et de Porc est plus élevée que celle des urines correspondantes.

Le diphénylphosphate qui est hydrolysé facilement et d'une façon importante a pH 5,2 par le sérum ne l'est que d'une façon infime par l'urine d'Homme ou de Porc, par les macérations de prostate et par la phosphatase du sperme. Ceci constitue une différence importante entre ces dernières préparations et le sérum. La diestérase

du sérum ne semble pas diffuser au niveau du rein.

Elle n'est présente qu'en très faible proportion dans les préparations prostatiques, surtout si on compare son activité à celle très élevée de la monoestérase de la prostate de l'Homme.

Nous avons comparé dans le tableau XXIII les rapports entre l'activité de la monoestérase et de la diestérase dans les diverses préparations étudiées.

A ce propose, il est interessant de signaler que l'activité diestérasique du sperme est proportionnellement plus élevée par rapport à l'activité monoestérasique que celle de la prostate. Ceci semble indiquer que l'activité phosphatasique du sperme humain ne provient pas exclusivement de la prostate et permet de supposer que les testicules ou les glandes annexes contribuent par leurs secrétions à l'apport de la fraction phosphatasique active sur les diesters. La prostate humaine a une activité beaucoup plus élevée que celle de Porc.

D'une façon générale, le sérum de Porc a une activité phosphatasique sensiblement plus élevée que celui de l'Homme alors que, au contraire, l'activité de l'urine de Porc est très variable et plus faible que celle d'Homme.

Nous n'avons pas noté de divergence notable entre les préparations provenant de l'Homme et celles de Porc; les unes et les autres hydrolysent les divers substrats dans des proportions très comparables.

CONCLUSIONS :

Le sérum d'Homme et celui de Porc renferment des phosphatases acides présentant un champ d'action plus étendu que les phosphatases des urines, de la prostate ou du sperme. En particulier, les diesters sont hydrolysés de façon très nette par le sérum, alors qu'ils ne le sont que d'une façon insignifiante par les autres préparations étudiées. Ce sérum possède de plus une légère activité phytasique alors que celle de l'urine est infime et que la prostate est totalement dépourvue de phytase.

QUATRIEME PARTIE

ETUDE DES PHOSPHODIESTERASES

INTRODUCTION :

Les résultats exposés au chapitre précédent nous ayant montré la présence dans les sérums d'Homme et de Porc d'enzymes hydrolysant le diphénylphosphate, nous avons continué ce travail par l'étude des phosphodiestérases.

Il semble actuellement démontré sans ambigüité que les diesters sont hydrolysé en monoester et alcool ou phénol par une catégorie de phosphatases spécifiques : les phosphodiestérases.

Le monoester formé est ensuite susceptible d'être dédoublé par les phosphomonoestérases spécifiques.

On connait diverses préparations phosphatasiques actives sur les monoesters et pratiquement dépourvues d'activité sur les diesters : Urine, COURTOIS et BIGET (27); Moutarde blanche, COURTOIS (26); Armillaria Mellea (à pH 3,2), NGUYEN VAN THOAI (72); Suc d'Orange (AXELROD (2).

Par ailleurs, dans les préparations où coexistent des mono et diestérases, il a été possible d'obtenir par adsorption et élution la seule phosphomonoestérase : taka-diastase, Son de Riz, UZAWA (97), Foie et Rein, ROCHE et LATREILLE (85).

Jusqu'ici les techniques d'adsorption n'ont pas permis d'isoler une préparation active sur les diesters et dépourvue d'action sur les monoesters.

Par contre, GULLAND et JACKSON (46) étudiant un certain nombre de venins caractérisent dans tous une phosphodiestérase; la plupart renferment également une monoestérase, mais quatre de ces venins, ceux de Crotale, Mocassin d'eau (Agkistradon piscivorus) "Tête de Cuivre" (Agkistradon Mokassin) et d'un Colubridé (Bungarus fasciatus), hydrolysent le diphénylphosphate sans

dédoubler ensuite le monophénylphosphate qui en dérive.

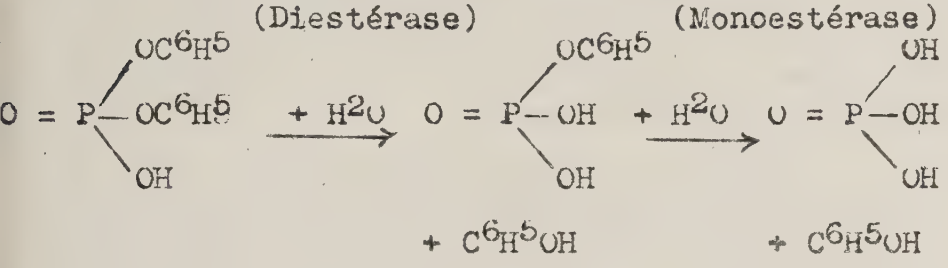
Les résultats obtenus au cours du chapitre précédent nous ont montré que les sérums d'Homme et de Porc hydrolysaient le diphénylphosphate à pH 5,2 alors que l'urine, les macérations de prostate et le sperme qui renferment une monoestérase très active en milieu acide ne présentaient qu'une activité très faible sur le diphénylphosphate.

Nous avons entrepris dans cette partie de notre travail d'étudier d'une façon plus précise les diestérases contenues dans le sérum; nous avons utilisé le sérum de Porc qui présente une activité plus élevée que celui d' Homme et qu'il nous était plus facile d'obtenir en quantité importante.

CHAPITRE I

ETUDE DE L'ACTION DES PHOSPHATASES SUR LE DIPHENYLPHOSPHATE

L'action des phosphatases sur le diphénylphosphate peut être schématisée ainsi :



l'action de la diestérase libérant une molécule de monophénylphosphate et une molécule de phénol; la monoestérase hydrolysant ensuite le monophénylphosphate formé pour libérer une molécule de PO^4H^3 et une seconde molécule de phénol.

Dans les préparations riches en monoestérase, comme celles que nous avons étudiées au chapitre précédent (urine, prostate, sperme), nous pouvions admettre que le pourcentage d'acide phosphorique libéré fournissait une mesure sinon exacte, du moins comparable de l'activité des diestérases mais il n'en est plus de même si nous voulons étudier des préparations pauvres en monoestérase ou si nous opérons dans des conditions défavorables à son activité.

Dans le cas présent, où nous nous proposions d'abord d'étudier l'activité des diestérases en fonction du pH, nous avons jugé nécessaire de doser systématiquement le phénol et l'acide phosphorique dans les liquides ayant été soumis à l'hydrolyse diastasique. Après avoir calculé la quantité de phénol correspondant à l'acide phosphorique dosé et provenant de la seconde phase de l'hydrolyse (action de la monoestérase), nous avons déduit cette valeur du phénol total pour connaitre la fraction de celui-ci correspondant à l'action propre de la diestérase.

Il nous a été ainsi possible de connaître le pourcentage d'hydrolyse du diphénylphosphate en monophénylphosphate et d'étudier l'activité de la diestérase indépendamment des facteurs agissant sur la monoestérase.

Le rapport du phénol I provenant du monoester au phénol 2 provenant du diester indique la proportion de monpphénylphosphate hydrolysé et donne une idée de l'activité de la monoestérase par rapport à la diestérase.

Ce rapport varie entre I et O, dans le cas d'une monoestérase très active, l'hydrolyse du monophénylphosphate est très rapide et le rapport tend vers I; au contraire, dans le cas d'une monoestérase peu active, le rapport diminue et tend vers O si celle-ci est absente du milieu.

PREPARATION DU SUBSTRAT :

Il importait pour ces recherches d'utiliser un substrat particulièrement pur et ne renfermant pas de monoester.

Nous avons utilisé l'acide diphénylphosphorique pur, que nous avons préparé selon la technique indiquée précédemment (page 86) et que nous obtenons apres recristallisation en cristaux prismatiques biobliques (système triclinique) retenant deux molécules d'eau.

Une solution M/IO de ce substrat a été obtenue par simple dissolution dans la quantité théorique de soude et ajustage à pH 7.

L'acide diphénylphosphorique étant un acide fort, le pouvoir tampon de ce substrat est négligeable et il est inutile de procéder à l'ajustement de la solution aux pH auxquels doivent s'effectuer les essais.

CHAPITRE II

DOSAGE DU PHENOL

Nous avons utilisé pour le dosage du phénol le réactif phosphotungstomolybdique dit "Réactif des Phénols" de Folin et Denis (formule de H. Wu (104), qui donne en milieu alcalin une coloration bleu grisâtre avec les corps à fonction phénol libre.

Réactifs :

1°) Réactif des Phénols de Folin et Denis (formule de H. Wu)

Tungstate de Na	100 g.
Molybdate de Na	25 g.
Eau distillée	700 cm^3

Après dissolution, ajouter 50 cm^3 d'acide phosphorique à 85 pour 100 (ou 106,5 cm^3 d'acide du Codex) et 100 cm^3 d'acide chlorhydrique concentré. Faire bouillir à reflux pendant huit heures, puis diluer à une litre après refroidissement (a).

2°) Solution alcaline

Carbonate de sodium cristallisé à 10 H_2O	12 g.
Eau, q.s.pour	60 cm^3

Faire dissoudre, filtrer, ajuster à 60 cm^3, puis ajouter : NaOH, solution Normale 40 cm^3

3°) Solution Etalon de Phénol

Phénol redistillé pur et sec	0,200 g.
Eau distillée, q.s.pour	100 cm^3

Cette solution doit être diluée au centième pour l'emploi.

5 cm^3 de dilution contiennent 100 microgrammes de Phénol.

(a) Si le réactif présente après vieillissement une teinte verdâtre, le ramener à teinte jaune par addition de quelques gouttes de solution de permanganate de potassium.

Nous avons redistillé le phénol du commerce en le plaçant dans une fiole conique surmontée d'un réfrigérant à reflux; nous plaçons sous l'extrémité du réfrigérant se trouvant à l'intérieur de la fiole un tube à essais suspendu au bouchon. Nous chauffons et le phénol qui distille retombe dans le tube à essais. Lorsque la température de distillation est constante, nous changeons rapidement le tube à essais et recueillons les portions qui distillent alors, les premières portions entraînant toujours un peu d'eau.

Technique de Dosage

Après quelques tâtonnements, nous avons adopté la technique suivante que nous avons vérifiée sur des solutions contenant de 20 à 500 microgrammes de phénol dans la prise d'essai.

Dans un tube à essais, nous mesurons :

Prise d'essai	7,0 cm^3
Réactif des phénols dilué au I/3	3,0 "
Solution alcaline	2,5 "

Nous agitons promptement et plaçons les tubes au bain-marie à 100° pendant 3 minutes exactement et nous les refroidissons dans l'eau.

Nous préparons en même temps un tube standard renfermant 100 γ de phénol pour un même volume total.

Pour les dosages précis, nous effectuons en même temps deux essais à blanc, contenant de l'eau distillée.

Nous comparons les tubes au photomètre ou au Colorimètre de Duboscq (avec écran jaune faible) avec le tube standard.

CALCUL :

Il est important de tenir compte dans les calculs de la légère teinte bleue obtenue dans les essais à blanc. Si le dosage est effectué au photomètre, l'absorption due à cette colo-

ration est déduite des tubes de dosage et du tube standard et le photomètre étalonné en conséquence. Si le dosage est effectué au Colorimètre de Duboscq, nous déduisons le chiffre obtenu pour les essais à blanc (mélangés) exprimé en phénol, de la valeur obtenue pour les tubes de dosage et de celle du tube Standard, puis nous rétablissons la proportionnalité en divisant par le chiffre corrigé pour le tube Standard et multipliant par la valeur théorique de ce même tube (100 γ).

A titre d'exemple, nous indiquons dans le tableau XXIII, les valeurs que nous avons obtenues au cours de la mise au point de cette technique.

En opérant dans ces conditions, la réaction suit la Loi de Beer Lambert et la teinte bleue s'est montrée très sensiblement proportionnelle à la teneur en phénol jusqu'à 500 γ dans la prise d'essai (erreur moyenne $< \pm$ I,5 p. I00) et il ne se produit aucune précipitation gênant les mesures colorimétriques.

TABLEAU XXIII

ETUDE DU DOSAGE COLORIMETRIQUE DU PHENOL

Quantité de phénol introduite en γ	Hauteur de la colonne liquide en mm.	Phénol trouvé (chiffre corrigé par calcul) en γ	Erreur relative p.I00
Blanc 0	69,0	0	0
20	38,2	2I,4	+7,0
40	27,8	40,3	+0,75
60	2I,5	60,4	+0,66
80	I7,7	79,5	-0,62
StandardI00	I5,0	I00.	0
200	8,25	203,5	+I,75
300	5,85	298.	-0,66
400	4,4I	405.	+I,25
500	3,52	5I5.	+3,0

Les dosages colorimétriques ont été pratiqués au Colorimètre de Duboscq (moyenne de 4 mesures) les calculs sont éffectués ainsi qu'il a été précisé dans le texte ci-dessus.

CHAPITRE III

ETUDE DES SUBSTANCES TAMPONS UTILISEES

L'action de la diestérase sur le diphénylphosphate libère la seconde acidité de l'acide phosphorique d'une part, et, d'autre part, une molécule de phénol; or, la molécule de phénol a un caractère acide et la deuxième acidité de l'acide phosphorique présente une acidité moyenne titrable à l'hélianthine il y a donc une notabl acidification du milieu. Cette acidification est beaucoup plus importante que celle due à l'hydrolyse des monoesters qui met en liberté la troisième acidité de l'acide phosphorique, laquelle est très peu ionisée.

Il s'ensuit donc une difficulté particulière pour mesurer avec précision le pH optimum des diestérases et cette mesure implique la nécessité d'employer des solutions tampon concentrées et efficaces dans la zône étudiée.

Au cours des essais qui vont suivre, nous avons utilisé les systèmes tampons suivants à la concentration M/20 :

de pH 2,5 à 4,0: Phtalate acide de K + H Cl
de pH 4,0 à 6,0: " " K + NaOH
(selon CLARK et LUBS (20)
de pH 7,0 à 9,4: Diéthylbarbiturate sodique + H Cl
(selon MICHAELIS (70)

Toutefois, après quelques essais, l'examen des courbes de neutralisation de ces substances nous a montré que leur pouvoir tampon était trop faible pour que nous puissions les utiliser entre pH 6,0 et 7,0. Il se trouvait donc une zône pour laquelle il n'existait pas à notre connaissance de tampon pratique, sauf celui aux phosphates mono-et dialcalins inutilisable pour nous, car les phosphates sont inhibiteurs et le dosage de petites quantités d'acide phosphorique libérées en présence d'une quantité de phosphates beaucoup plus élevées se fut avéré impossible.

Nous avons songé à utiliser l'acide citrique dont la troisième acidité (pK = 6,47) présente un pouvoir tampon dans la zône considérée; mais les citrates donnent des complexes molybdiques, LUNDSTEEN (64), qui perturbent le dosage du phosphore selon la méthode de BRIGGS.

Après avoir passé en revue de nombreux corps ne donnant pas satisfaction, nous avons retenu le cacodylate de sodium ou diméthylarsinate monosodique dont le pouvoir tampon a déjà été signalé par Mr. GOURSAT (42) et dont nous avons étudié ci-dessous la courbe de neutralisation par ClH N/10.

Nous avons utilisé le sel chimiquement pur à 3 OH^2, le produit commercial destiné le plus souvent à la préparation des solutés injectables n'est pas toujours complétement neutralisé et contient une faible proportion d'acide cacodylique libre, F.MARTIN (68), et a des teneurs en eau de cristallisation assez variables.

Nous avons préféré utiliser le sel à 3 molécules d'eau plutôt que le sel anhydre qu'il est difficile de conserver.

ETUDE DU TITRAGE DU CACODYLATE DE SODIUM EN SOLUTION M/10.

2,140 g. de diméthylarsinate monosodique pur à 3 H^2O sont dissous dans 10 cm^3 d'eau privée de CO^2; nous ajoutons 2 gouttes de solution de thymolphtaléine à 0,1 p.100 puis la quantité nécessaire de NaOH N pour amener à une teinte bleu-pâle; nous complétons à 100 cm^3 d'eau avec de l'eau distillée.

10 cm^3 de cette solution titrée par ClH N/10 en présence de l'indicateur suivant jusqu'à teinte brun grisâtre en consomment 10 cm^3.

Indicateur :

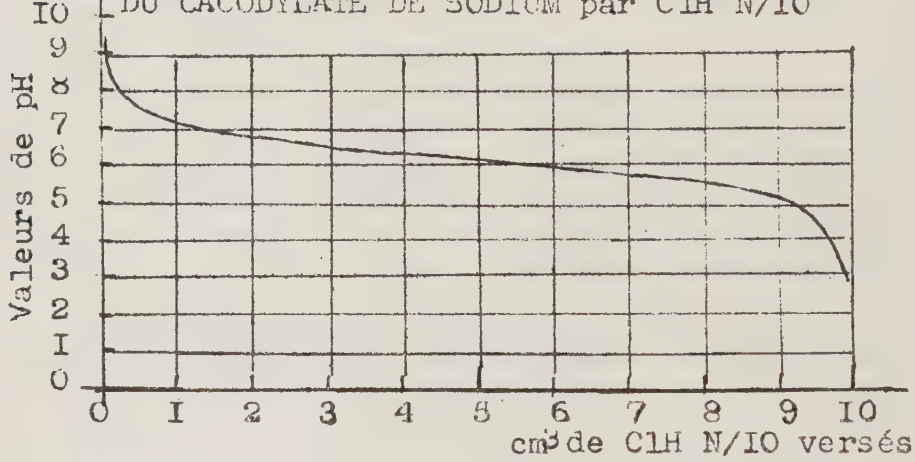
(Solution aqueuse de Bleu de) Méthylène à 1 p.100	3,2 cm^3
(Alcool à 95°	36,8 "
) Solution alcoolique d'hélianthine à 1 p.100	10,0 "

Cet indicateur vire du vert au violacé avec une teinte sensible gris indécis pour pH 3,74.

Nous avons dressé la courbe de pH au cours de la neutralisation en vérifiant les valeurs trouvées d'abord par colorimétrie à l'électrode de verre.

Courbe n° II

COURBE DE TITRATION
DU CACODYLATE DE SODIUM par ClH N/IO



L'examen de la courbe nous a montré que le point où la moitié de l'acide cacodylique est neutralisé (pH = pK) est voisin de 6,I5 et d'autre part, la pente de la courbe étant faible, que ce corps a un pouvoir tampon considérable.

En pratique, ce tampon a une action satisfaisante de 5,2 à 7,2 et nous avons pu obtenir une gamme de pH en ajoutant à IO cm³ de cacodylate M/IO les volumes suivants de ClH N/IO et complétant à 20 cm³ avec de l'eau distillée.

Tableau XXIV

ECHELLE DE pH AVEC LE TAMPON AU CACODYLATE (à 20°)

pH	HCl N/IO	pH	HCl N/IO
5,0	9,35	6,2	4,77
5,2	9,0I	6,4	3,65
5,4	8,52	6,6	2,66
5,6	7,84	6,8	I,86
5,8	6,96	7,0	I,26
6,0	5,9I	7,2	0,83
		7,4	0,54

Ce tampon au cacodylate prend place entre le tampon au phtalate acide de K-NaOH de Clark (pH 4 à 6) et celui au diéthylbarbiturate de sodium - HCl de Michaëlis (pH 7 à 9,4).

Nous avons vérifié que son emploi n'inhibait pas l'activité des monoestérases ou des diestérases au cours de l'essai suivant; son emploi semble même préférable a celui du tampon acétique.

Tableau XXV

ACTION DU CACODYLATE SUR L'HYDROLYSE.

	Tampon acétique M/IO à pH 5,2	Tampon cacodylate M/IO à pH 5,2
Activité du sérum de Porc sur le Monophénylphosphate	33,I mg.	34,3 mg.
d° sur le Diphénylphosphate	4,68 "	5,0 "

Les chiffres représentent le P. libéré (en mg.) en 24 heures rapporté à I00 cm^3 de sérum.

Nous avons également vérifié que la présence de ce corps ne gênait pas les dosages colorimétriques du phénol selon la technique exposée plus haut et qu'il ne perturbait pas le dosage du phosphore par la méthode de Briggs, à condition toutefois qu'il ne renferme pas d'arséniate de sodium, d'où la nécessité d'utiliser du cacodylate de sodium pur.

CHAPITRE IV

ETUDE DE L'HYDROLYSE DU MONOPHENYLPHOSPHATE EN FONCTION DU pH.

Avant de commencer l'étude des diestérases, afin de vérifier nos techniques en particulier la concordance entre les dosages de phosphore et de phénol et la précision que nous en pouvions attendre, nous avons étudié l'hydrolyse en fonction du pH de l'acide monophénylphosphorique.

Réactifs :

Substrat M/10

(Monophénylphosphate de sodium 2,54 g.
) Eau distillée, q.s.pour 100 cm^3

Tampon au phtalate

(Phtalate acide de K M/ 5 2,5 cm^3
) HCl N/5 ou NaOH N/5 : quantité
(variable selon le pH à obtenir (a)
) Eau, q.s. pour concentration M/20
(en phtalate dans l'eaaai

Tampon au véronal - solution mère M/5

(Acide diéthylbarbiturique
) pur et sec 3,682 g.
(Soude normale 20 cm^3
) Eau q.s.pour 100 " (b)

Cette solution doit donner une teinte bleue franche avec la Thymolphtaléine et 10 cm^3 titrés par HCl N/5 en présence d'hélianthine en consomment 10 cm^3.

(a) selon CLARK (20)
(b) Nous faisons dissoudre le véronal dans la soude N en tiédissant légèrement.

Nous préparons les mélanges suivants :

(Véronal sodique M/5 2,5 cm^3
) HCl : quantité variable recal-
(culée selon Michaëlis (70)
) Eau, q.s. pour concentration
M/20 dans l'essai

Colorants indicateurs de pH (selon Clark et Lubs) :

pH 3,0 à 4,6 : Bleu de Bromophénol, solutions diluées
" 4,4 à 6,0 : Rouge de Méthyle " "
" 6,0 à 7,8 : Bleu Bromothymol " "
" 8,0 à 9,6 : Bleu de Thymol (2°virage)" "

Technique :

Dans chaque tube de dosage, nous avons placé 2 cm^3 de substrat M/IO au monophényl phosphate que nous avons amené au pH voulu par ajustement colorimétrique à la même teinte que le mélange tampon utilisé, 5 cm^3 de tampon M/IO, I cm^3 de sérum et eau saturée de chloroforme q.s. pour IO cm^3.

Chaque tube de dosage a été accompagné de deux tubes témoins établis selon les principes exposés page 98 (technique de précision).

Nous avons maintenu 24 heures au thermostat à 37°. Au sortir du thermostat, les tubes témoins ont été mélangés et le tube dosage dilué avec IO cm^3 de tampon M/20. La défécation est pratiquée par 4 cm^3 d'acide trichloracétique à 25 g. pour IOO cm^3.

Dans les tubes tamponnés à un pH plus faible que 5,0, il y a formation, au cours de l'incubation, avec les protéines du sérum, d'une petite quantité d'acidalbumine, qui ne précipite pas par addition d'acide trichloracétique, mais reprécipite par le Réactif sulfomolybdique au cours du dosage du phosphore; on évite cet inconvénient en ajoutant avant la défécation I cm^3 de soude N, laissant en contact I/2 heure, puis déféquant par 5 cm^3 d'acide trichloracétique. On traite de même

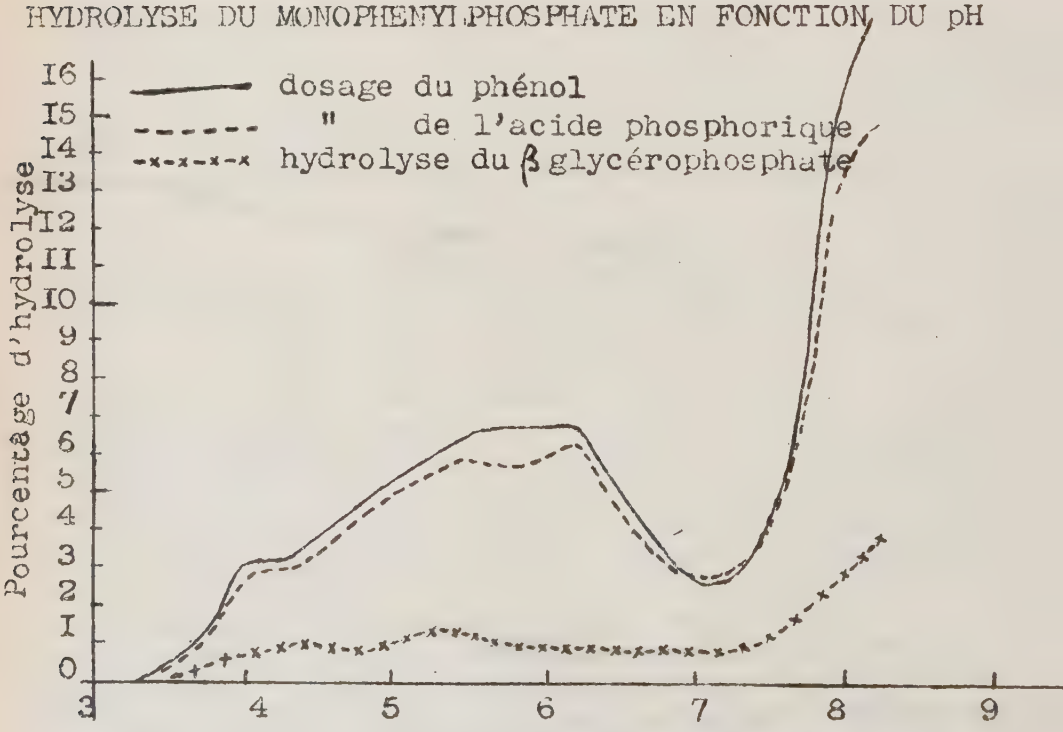
le tube témoin contenant le sérum et on tient compte de la dilution dans le calcul. Nous pratiquons les dosages de l'acide phosphorique sur 12 cm^3 de filtrat et le dosage du phénol sur 2cm^3 selon les techniques déjà décrites.

Dans les essais comportant un dosage de phénol, nous avons évité l'emploi de toluène comme antiseptique, le phénol étant très soluble dans ce produit; nous avons employé le chloroforme qui se dissout dans le milieu.

Les résultats exprimés en pourcentage d'hydrolyse en fonction des chiffres de phénol et de l'acide phosphorique dosés sont exposés dans la courbe n° III.

Courbe n° III

HYDROLYSE DU MONOPHENYLPHOSPHATE EN FONCTION DU pH



Nous avons joint, à titre comparatif, la courbe obtenue dans les mêmes conditions pour l'hydrolyse du β glycérophosphate de sodium (dosage de l'acide phosphorique).

DISCUSSION DES RESULTATS :

L'allure de la courbe montre la présence des trois monoestérases déjà connues et leur activité relative. Elle montre la bonne concordance entre les chiffres obtenus pour le dosage de l'acide phosphorique et le dosage du phénol. Les quantités de phénol et PO^4H^3 libérées correspondent donc bien à l'hydrolyse du monophénylphosphate et non à une hydrolyse associée à la transphosphorylation d'AXELROD (3). Cet auteur a, en effet, mis en évidence un enzyme présent dans le suc d'orange ou l'urine qui provoque le transfert de l'acide phosphorique estérifiant un phénol sur un alcool acyclique présent dans le milieu. C'est ainsi que cet enzyme réagissant sur le p.-nitro-phénylphosphate en présence d'alcool méthylique provoque la synthèse d'acide monométhyl-orthophosphorique.

Les résultats sont exprimés en fonction du pH mesuré avant l'hydrolyse; nous avons en effet remarqué qu'il n'y avait pas accord entre le pH du tampon utilisé et celui du mélange avec le sérum, les protéines du sérum ont un pouvoir tampon très élevé qui s'oppose à la diminution du pH au-dessous de pH 5,0 et qui agit encore pour s'opposer à l'alcalinisation de plus en plus, au fur et à mesure que l'on s'éloigne de pH 5,0.

Aux environs de pH 5,0 semble exister une zône où le pouvoir tampon des protéines du sérum de Porc est nul, correspondant sans doute au point isoélectrique des protéines les plus abondantes dans le sérum.

CHAPITRE V

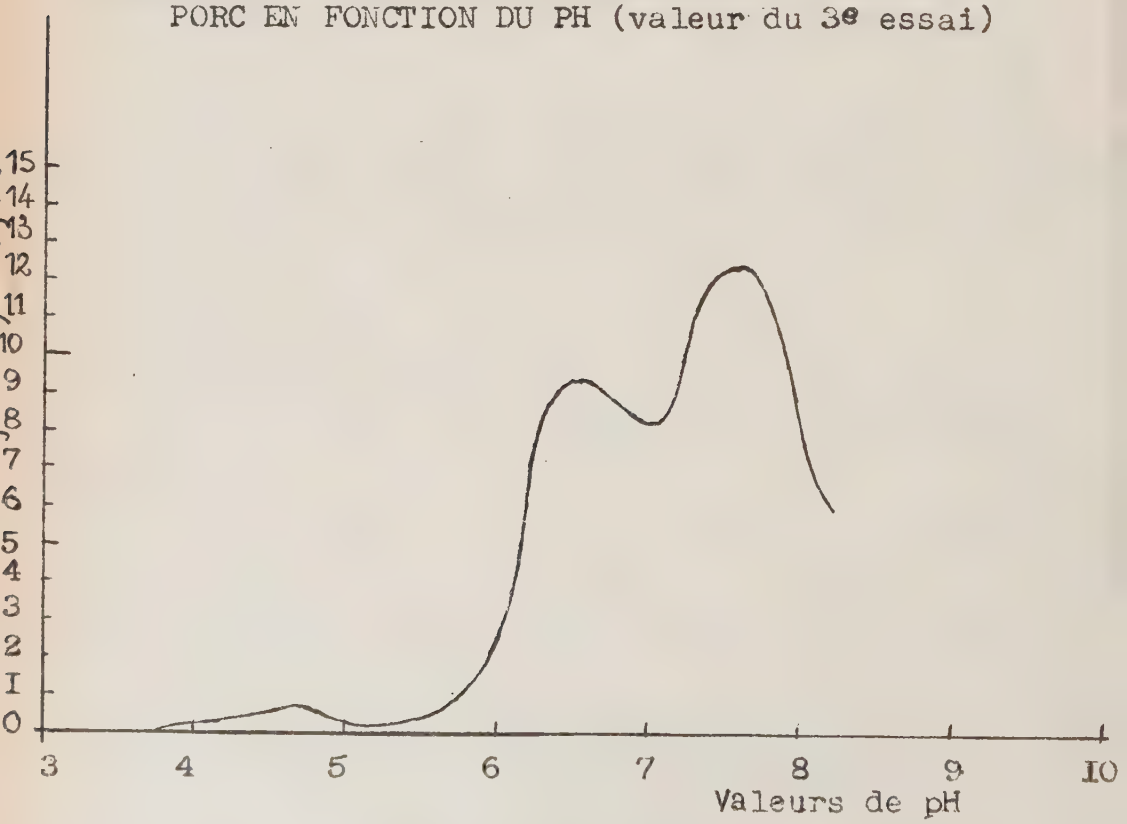
ETUDE DE L'HYDROLYSE DU DIPHENYLPHOSPHATE EN FONCTION DU pH.

Nous avons étudié l'hydrolyse du diphénylphosphate de sodium en fonction du pH, dans les conditions de concentration et de dosage exposées pour le monophénylphosphate.

Nous avons obtenu les résultats suivants qui sont exposés dans le tableau XXVIIet la courbe IV. ci-dessous

Courbe n° IV

HYDROLYSE DU DIPHENYLPHOSPHATE PAR LE SERUM DE PORC EN FONCTION DU PH (valeur du 3e essai)



HYDROLYSE (I) DU DIPHENYLPHOSPHATE PAR LE SERUM DE PORC EN FONCTION DU pH (valeurs du 3e essai)

Tableau XXVII

HYDROLYSE DU DIPHENYLPHOSPHATE EN FONCTION DU pH PAR LE SERUM DE PORC.

	pH du tampon utilisé	pH mélange avant incubation	Ier essai		2ème essai		3ème essai	
			% d'hyd.(1) du diester	% d'hyd. monoester formé	% d'hyd.(1) du diester	% d'hyd. monoester formé	% d'hyd.(1) du diester	% d'hyd. monoester formé
PHTALATE	2,5	3,35	0	0	0,35	0	0	0
	3,0	3,65	0,I8	I3,2	0,24	0	0,02	0
	3,5	4,0	0,I8	38,7	0,32	44,5	0,47	30
	4,0	4,3	0,22	I00	0,64	36,6	0,50	28
	4,5	4,6	0,I8	63	0,62	4I,3	0,80	22,6
	5,0	5,0	0,24	74	0,66	55,0	0,33	63
	5,5	5,4	0,28	33,2	0,99	44,0	0,48	60
VERONAL	6,0	5,8	0,60	I9,6	I,57	36,7	I,43	5I,4
	6,5	6,2	I,33	II,2	7,90	I8,7	8,2	I4,8
	7,0	6,6	2,02	8,6	8,62	I4,2	9,7	30,2
	7,5	7,0	3,I3	I0,3	I0,0	II,5	6,05	29,5
	8,0	7,3	2,48	28,5	9,06	22,0	9,5	33,9
	8,5	7,7	3,6I	44,3	9,45	45,3	I0,5	52,8
	9,0	7,9	2,9I	82,0	8,45	74,2	9,2	62,7
	9,5	8,I	2,52	9I,5	6,2	78,0	7,66	64,8
	I0	8,25	2,9	98,7	5,02	74,4	6,5	69,7

(1) hydrolyse du diester en monoester.

Tableau XXVIII

HYDROLYSE DU DIPHENYLPHOSPHATE EN FONCTION DU pH PAR LE SERUM DE PORC.

pH du tampon utilisé Cacodylate M/IO	pH après hydrolyse	4ème essai		pH du tampon utilisé Cacodylate M/IO	pH avant hydrolyse	5ème essai	
		% d'hydrol. du diester (I)	% d'hydrol. monoester formé			% d'hydrol. du diester (I)	% d'hydrol. monoester formé
4,0	4,2	2,92	33,				
4,6	4,6	5,24	37,				
5,0	5,0	7,30	32,	5,0	5,0	4,48	I2,
5,6	5,6	I,90	I00,	5,2	5,2	4,7	II,8
5,8	5,7	8,06	32,	5,4	5,4	5,3	I2,7
5,95	5,9	7,74	33,	5,6	5,6	4,35	I6,
6,I	6,05	8,44	29,5	5,8	5,75	5,2	I5,7
6,2	6,I	8,66	27,	6,0	5,9	5,I	I3,4
6,25	6,I5	9,I7	24,	6,2	6,I	5,2	I0,7
6,4	6,3	9,I5	22,	6,4	6,3	5,35	7,6
6,6	6,4	I0,8	I8,	6,6	6,4	5,9	5,9
6,8	6,6	II,I4	I6,	6,8	6,6	6,4	4,75
6,9	6,7	9,77	I8,	7,0	6,8	6,05	5,8
7,I	6,85	9,I5	20,	7,2	6,9	6,5	5,4
7,4	7,0	I0,82	20,				
7,5	7,I	I0,46	23,				

(I) : Les chiffres représentent les pourcentages d'hydrolyse du diester en monoester, calculés en fonction des dosages du Phénol et de l'acide phosphorique libéré.

Tableau XXVIII (suite)

HYDROLYSE DU DIPHENYLPHOSPHATE EN FONCTION DU pH PAR LE SERUM DE PORC.

pH du tampon utilisé (Véronal M/10)	pH avant hydrolyse	6ème essai	
		% d'hydrol. du diester (I)	% d'hydrol. monoester formé
7,2	7,0	6,05	3,9
7,4	7,I	5,4	5,7
7,6	7,3	5,3	7,I
7,8	7,5	4,9	9,5
8,0	7,6	4,2	I2,0
8,2	7,7	3,7	I8,0
8,4	7,8	3,8	22,7
8,6	8,0	3,I	32,4
8,8	8,2	3,I	3I,0
9,0	8,4	2,5	30,0
9,2	8,5	2,48	29,7
9,4	8,6	I,9	32,2
9,6	8,7	I,7	33,2

(I) les chiffres représentent les pourcentages d'hydrolyse du diester en monoester calculés en fonction des dosages du phénol et de l'acide phosphorique libéré.

Nous nous sommes rendu compte alors que les tampons utilisés ci-dessus remplissaient mal leur rôle aux environs de pH 6,5; le pH ayant varié sensiblement au cours de l'hydrolyse, nous avons utilisé alors le tampon au cacodylate de sodium décrit plus haut à la concentration M/IO, dans deux essais: nous avons obtenu les résultats qui sont exprimés au tableau XXVIII (page I22).

Nous avons ainsi obtenu des courbes de même aspect présentant 3 sommets nettement délimités, mais avec un décalage assez net pour les sommets du premier et du troisième clocher.

Nous avons attribué cette différence à une meilleure régulation du pH au cours de l'hydrolyse due à l'emploi d'un tampon plus concentré et mieux approprié.

DISCUSSION DES RESULTATS :

L'examen des résultats montre l'existence dans le sérum de Porc de trois diestérases présentant des pH optimum nettement délimités.

Le premier maximum vers pH 4.6 - 5,2 correspond à une activité diestérasique très faible, surtout si on la compare aux valeurs trouvées pour la monoestérase à ce pH.

Le second clocher vers pH 6,6 présente une pente très accentuée et une bande assez étroite d'activité; nous avons retrouvé ce caractère au cours de divers essais successifs.

Le troisième possède une bande plus large d'activité et un sommet vers pH 7,0 - 7,3; il correspond probablement à la phosphodiestérase déjà décrite (84) comme ayant un pH optimum vers 7,6; en effet, si l'on s'en tient uniquement aux chiffres obtenus pour le dosage du phosphore, on trouve ici un sommet entre pH 7,7 et 7,9. Ceci s'explique par l'action de la monoestérase qui, très active à partir de 7,5, hydrolyse à ces pH une fraction plus importante du monophénylphosphate formé qu'à pH 7,3, d'où la nécessité d'opérer les

dosages doubles de phosphore et de phénol pour obtenir des résultats corrects.

Nous avons résumé dans le tableau XXIX les valeurs trouvées pour le pH optimum des trois phosphodiestérases mises en évidence.

Tableau XXIX

pH OPTIMA DES PHOSPHODIESTERASES DU SERUM DE PORC

	pH mesuré :	Ier sommet	2ème sommet	3ème sommet
Ière série	avant hydrolyse	a) 4,3	b) 7,0	b) 7,7
2ème "	" "	a) 4,3	b) 7,0	b) 7,7
3ème "	après "	a) 4,6	b) 6,6	b) 7,3
4ème "	avant "	c) 5,0	c) 6,6	c) 7,0
5ème "	" "	c) 5,4	c) 6,6	b) 7,0

a) Tampon phtalate M/20
b) " véronal M/20
c) " cacodylate M/IO

CONCLUSIONS :

Nous avons pu mettre en évidence dans le sérum de Porc par une technique rigoureuse nécessitant le dosage du phénol et de l'acide phosphorique libérés dans les produits d'hydrolyse, trois diestérases (ou trois groupes de diestérases), la première ayant un pH optimum entre pH 7,2 et 7,7 (valeur moyenne 7,3), la seconde a un pH optimum situé au voisinage de 6,6, la troisième n'existant qu'en faible proportion dans le sérum a un pH optimum situé entre pH 4,3 et 5,2, selon la concentration en sel tampon.

Il n'y a pas identité entre les pH optima des phosphodiestérases isodynames et ceux des phosphomonoestérases isodynames de la classification de FOLLEY et KAY (40).

Il apparait cependant une analogie entre la diestérase de pH optimum 7,0-7,9 et la phosphomonoestérase alcaline I, bien que la diestérase possède un pH optimum dans une zône plus acide.

La diestérase active à pH 6,6 a sensiblement le même pH optimum que la phosphomonoestérase IV des hématies.

Enfin, la diestérase de pH optimum 4,6-5,2 a son pH optimum dans une zône plus acide mais assez proche de celui de la monoestérase.

L'étude de l'action d'effecteurs choisis sur ces diestérases permettra sans doute de fournir plus d'éléments pour comparer les mono et diestérases associées.

:-:-:-:-:-:

CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de ce travail, nous avons cherché à préciser l'origine et les propriétés de la phosphatase urinaire. Nous avons en premier lieu recherché s'il existait une relation entre les activités phosphatasiques du sérum ou de la prostate et celle des urines.

I) Dans l'espèce humaine, il n'existe aucun rapport entre les activités phosphatasiques II du sérum et de l'urine, ceci aussi bien chez les sujets normaux que chez d'autres sujets atteints d'affections diverses.

Nous avons pu tirer une conclusion semblable de l'examen des sérums et urines d'animaux divers. Tandis que les activités phosphatasiques II des sérums sont du même ordre de grandeur, les urines de certains animaux sont pratiquement dépourvues de phosphatase II, d'autres sont peu actives; seule l'urine de Porc présente une activité phosphatasique comparable à celle de l'urine humaine.

II) Chez l'Homme et les animaux étudiés il n'existe pas de rapport entre l'activité de la phosphatase alcaline I du sérum et celle de l'urine; d'ailleurs, presque toutes les urines sont dépourvues de phosphatase I.

III) Nous apportons quelques indications nouvelles sur la teneur du sérum humain en phosphatases I ou II au cours de diverses affections.

IV) Il n'existe pas de relation entre l'activité phosphatasique II de la prostate de l'Homme et de quelques animaux et l'activité phosphatasique II de l'urine.

Par la suite, nous nous sommes efforcés de préparer des échantillons de phosphatase urinaire purifiée afin d'en préciser les caractéristiques.

I°) Le relargage fractionné par le sulfate d'ammonium nous a permis de distinguer dans l'urine d'Homme deux fractions phosphatasiques distinctes :

a) la première est relarguée vers 62 p. 100 de la saturation en sulfate d'ammonium; cette phosphatase parait être d'origine prostatique et est fragile comme l'enzyme de la prostate.

Si l'urine est additionnée de solution de sulfate d'ammonium pour obtenir des concentrations s'échelonnant entre 65 et 90 p.100 de la saturation, le précipité formé est beaucoup moins actif que vers 60 p.100 de saturation, comme si la forte salinité du milieu avait inactivé l'enzyme. Cet enzyme fait pratiquement défaut dans l'urine de Femme, mais l'urine de Femme additionnée de suc prostatique se comporte alors comme l'urine d'Homme.

b) la seconde fraction ne précipite qu'au voisinage de la saturation en sulfate d'ammonium; cette phosphatase, présente à la fois dans les urines d'Homme et de Femme, parait être d'origine sérique.

2°) La précipitation fractionnée par l'éthanol s'accompagne d'une assez forte dénaturation des enzymes. Toutefois, l'urine d'Homme parait renfermer une fraction très fragile comme l'enzyme prostatique.

3°) La précipitation fractionnée par l'acétone fournit des préparations plus actives que la précipitation alcoolique.

L'urine d'Homme renferme également une fraction de phosphatase facilement inactivée qui parait absente de l'urine de Femme.

4°) Nous avons étudié la fixation de la phosphatase urinaire sur divers précipités formés au sein de l'urine; il a été possible d'obtenir des préparations très actives en fixant la phosphatase sur des précipités de phosphate de cadmium ou de zinc.

Nous avons donné la préférence au sel de cadmium, sans action inhibitrice nette que la phosphatase, tandis que les sels de zinc exercent une inhibition assez importante.

Nous avons ensuite comparé l'action sur divers esters phosphoriques des phosphatases du sérum, de la prostate et d'échantillons de phosphatase urinaire purifiés par précipitation cadmique.

Les phosphatases urinaires de l'Homme et du Porc se comportent sensiblement de la même façon vis à vis des divers substrats étudiés.

Par ailleurs, les phosphatases du sérum ont des spécificités voisines chez l'Homme et le Porc. Par contre, nous avons pu noter quelques divergences entre les enzymes sériques d'une part et urinaires d'autre part.

Pour les monoesters, ces différences sont minimes : l'acide phosphoglycolique est un meilleur substrat pour l'enzyme sérique que pour l'enzyme urinaire qui l'hydrolyse bien plus difficilement que les autres monoesters. Les phosphatases de l'urine et du sérum dédoublent rapidement les acides monophénylphosphorique, β glycérophosphorique et α glycérophosphorique, classés par ordre de vitesse d'hydrolyse décroissante.

Rien ne parait donc s'opposer de façon absolue à ce que les phosphomonoestérases du sérum et de l'urine soient identiques.

Cependant, nos résultats ne permettent pas d'affirmer que la phosphatase urinaire d'origine non prostatique a diffusé du sérum au niveau du rein.

Le sérum présente, par contre, une nette activité sur les diesters tandis que ces substrats ne sont pratiquement pas dédoublés par les enzymes de l'urine et de la prostate.

Nous avons mis au point une technique d'étude des diestérases basée sur le dosage de l'acide orthophosphorique et du phénol libérés à partir du diphénylphosphate; il est ainsi possible de suivre d'une façon régulière l'hydrolyse du diphénylphosphate en monophénylphosphate par la diestérase.

Cette technique nous a permis de mettre en évidence dans le sérum trois diestérases à pH optima distincts situés vers 4,7 - 6,6 et 7,2.

Nous décrivons en outre des techniques pratiques de préparation des acides monophényl et diphényl orthophosphoriques et nous avons mis au point la formule d'un mélange tampon cacodylate de sodium-acide chlorhydrique très utile dans l'étude des phosphatases.

:-:-:-:-:

BIBLIOGRAPHIE

I. ALLCROFT W.M. et FOLLEY S.J. - Biochem. J. I941 35 254

2. AXELROD B. - J. biol.Chem. I947 I67 57

3. AXELROD B. - J. biol.Chem. I948 I72 I

4. BAILLY O. - Bull.Soc.Chim.Fr. 1920 27 749

5. BAMANN E. et DIEDERICHS K. - Ber.deutsch.Chem.Ges. I935 68 6

6. BAMANN E. et SALZER W. - Ber.deutsch.Chem.Ges. I937 70 I263

7. BARAC G. - Bull.Soc.Chim.biol.Paris I947 29 836

8. BARNES D.J. et MUNKS B. - Proc.Soc.exp.biol.Med. I940 44 327

9. BELL R.D. et DOISY E.A. - J. biol.Chem. I920 44 55

IO. BIGET P. - Thèse Doct.Univ.Pharm. Paris I933

II. BODANSKY A. - J. biol.Chem. I933 IOI 93

I2. BODANSKY A. - J. biol. Chem. I934 I04 7I7

I3. BODANSKY A. et JAFFE H.L. - Arch.int.Med.exp. I934 54 88

I4. BREEDIS C., FLORY C. et FURTH J. - Arch.Path. I943 36 402

I5. BRIGGS A.P. - J. biol. Chem. I922 53 I3

I6. CARRE P. - Thèse Doct.Sciences Paris I904

I7. CAVALIER M. - Thèse Doct.sciences Paris I898

I8. CAVALIER M. - Bull.Soc.Chim. Fr. I898 I9 883

I9. CHERBULIEZ E. et WENIGER H. Helv.chim.Acta I946 29 2[illegible]06

20. CLARKS et LUBS - The Détermination of hydrogen Ions -Baltimore I923

2I. COHN E.J., MAC MEEKIN T.L., ONCLEY J.L., NEWELL J.M. et HUGHES W.L. J.Amer.chem.Soc. I940 62 3386

22. COPAUX H. - C.R. Ac.Sc. I92I I73 656
23. CORDEBARD H. -
J. Pharm.Chim. Paris I939 30 263
24. CORI C.F. et PRICE W.H. -
J. biol. Chem. I946 I62 393
25. CORYN G. -
Journ.Chirurg.Belge I934 5 2I3
26. COURTOIS J. -
Bull.Soc.chim.biol. Séance du 2I-I0-47 (sous presse)
27. COURTOIS J. et BIGET P. -
Bull.Soc.chim.biol.Paris I943 25 I03
28. COUVELAIRE R. et LAUDAT M. -
Paris med. I947 44 526
29. CRISTOL P. et CAYLA J. -
Bull. Biol. Pharm. I936 I68
30. DESJOBERT A. -
Bull. Soc.Chim.Fr. I947 I4 809
3I. DESRUISSEAUX G. -
C.R. Soc.Biol. I946 I40 644
32. DOGNON A. -
Bull.Soc.Chim. biol. I94I 23 249
33. DOGNON A. et DUMONTET A. -
C.R. Soc.biol. I94I I35 884
34. DUVOIR M., LAYANI M.F. et PAUTRAT J.-
Rev.Belge.Radiol. I936 25 240
35. FIESSINGER N. et BOYER F. -
Rev.Med.Chir.Mal.Foie I935 Mars
36. FLEURY P. -
Fiches techniques Chim.Biol. Vega éditeurs
37. FLEURY P. et COURTOIS J. -
Helv.Chim.Acta I946 29 I297
38. FLEURY P. et COURTOIS J. -
Bull.Soc.Chim.Fr. I94I 8 69
39. FLOOD C., GUTMAN E.B. et GUTMAN A.B. -
Amer.J. Physiol. I937 I20 696
40. FOLLEY S.J. et KAY H.D. -
Ergebn.Enzymforsch I936 5 378
4I. GOMORI G. -
Proc.Soc.exp.Biol. I939 42 23
42. GOURSAT E. -
J.Pharm.Chim.Paris I93I I4 434
43. GREENSTEIN J.P. -
Advances in Enzymology I943 3 3I5
44. GREENSTEIN J.P. et LEUTHARDT F.M. - J.nat.Cancer Inst. I946 6 2II

45. GUILLAUMIN C.P. -
Ann.Ther.Biol; I935 639
Exposés annuels Biochimie Médicale
46. GULLAND J.M. et JACKSON E.M.-
Biochem. J. I938 32 590
47. GUTMAN A.B. et GUTMAN E.B.-
J.Clin.Invest. I938 I7 47
48. GUTMAN A.B. et GUTMAN E.B.-
Proc.Soc.exp.Biol. I938 39 529
49. GUTMAN A.B. et GUTMAN E.B.-
J.biol.Chem. I940 I36 20I
50. GUTMAN A.B. et GUTMAN E.B.-
J.biol.Chem. I940 I36 42I
51. GUTMAN A.B., GUTMAN E.B.
et ROBINSON J.N. -
Chem.Centrabl. I940 2 II56
52. HADDOW A. -
Brit.J.Radiol. I943 N° Juillet
53. HANSEN P.F. -
Acta Pathologica et Microbio-
logica Scandinavica I946 23 I4
54. HERBERT F.A. -
Biochem.J. I944 38 23
55. HERBERT F.A. -
Quart.J.Med. I946 I5 22I
56. HERGER C.C. et SAUER H.R. -
J.Urol. I94I 46 286
57. HUGGINS C., STEVENS R.E.
et HODGES C.V.- Arch.Surg. I94I 43 209
58. KAY H.D. -
Brit.J.exp.Path. I929 I0 253
59. KUTSCHER W. et WOLBERGS H.
Z.physiol.Chem. I935 236 237
60. KUTSCHER W. et WORNER A. -
Z. physiol.Chem. I936 239 I09
61. LEVENE P. -
J.biol.Chem. I9I5 40 4I5
62. LIPMAN F. -
Advance in Enzymology I94I I 99
63. LUNDQUIST F. -
Nature G.B. I946 I58 7I0
64. LUNDSTEEN E. -
Enzymologia I939 5 383
65. LUNDSTEEN E. et WERMEHREN M.-
Enzymologia I939 6 27
66. MALLET-GUY et EXCOFFIER S.-
Lyor Méd. I942 I67 8I

67. MALLET-GUY et EXCOFFIER S. -
Lyon Méd. I942 I68 I0I
68. MARTIN F. -
Bull.Sci.pharm. I934 4I 2I
69. MASSART L. et DUFAIT R. -
Z. physiol. Chem. I942 272 I57
70. MICHAELIS L. -
J. biol. Chem. I930 87 33
7I. NGUYEN VAN THOAI -
Bull.Soc.chim.biol.Paris I94I 23 II83
72. NGUYEN VAN THOAI -
Bull.Soc.chim.biol.Paris I942 24 I077
73. NGUYEN VAN THOAI, ROCHE J. et SARTORI L. -
C.R. Soc.Biol. I944 I38 47
74. PAGET M. et DUPONT Y. -
Bull.guerre Biol.Pharm. I940
75. PAUTRAT J. -
Thèse Doct.Med.Paris I935
76. PETT L.B. et WYNNE A. M. -
Biochem. J. I933 27 I660
77. PETT M.B. et WYNNE A. M? -
Biochem. J. I938 32 563
78. POSTERNACK T. -
C.R. Ac.Sc. I9I9 I68 I2I6
79. POSTIC F., COURTOIS J. et RABATE J. -J.Pharm.Chim.Paris I94I I 526
80.RRAOUL Y. et VINET A. -
Bull. Soc.chim.biol.Paris I94I 23 205
8I. ROBERTS W.M. -
Brit.J.exp.Path. I930 II 90
82. ROBERTS W.M. -
Brit.Med.J. I933 I 734
83. ROCHE J. -
Bull.Soc.chim.biol.Paris I930 I2 636
84. ROCHE J. et COURTOIS J. -
Exposés annuels Biochim.Med. I944 4 2I9
85. ROCHE J. et LATREILLE M. -
Enzymologia I937 3 75
86. ROCHE J., NGUYEN VAN THOAI et BAUDOUIN J. -
Bull.Soc.chim.biol. I942 24 I247
87. ROCHE J., NGUYEN VAN THOAI et MARCELET J. -
C.R. Soc.Biol. I944 I38 5I7
88. ROCHE J., NGUYEN VAN THOAI, MARCELET J., DESRUISSEAUX G. et DURAND S. -
Bull.Acad.Med. I946

89. ROSAHN P.D. -
Proc.Soc.exp.Biol.Med. I935 32 I60I
90. ROUQUES L. -
Pr.Med. I945 25 344
9I. SANDORMAN W. -
Am.J. Path. I942 I2 404
92. SCHAFNER A. et BAUER E. -
Z.physiol.Chem. I934 225 245
93. SCHUCHARDT W. -
Biochem.Z. I936 283 433
94. SIMMONS C.C. et FRANZEEN C.C.
Surg.Gynec.and obst. I939 68 I038
95. SMITH J. et MAIZELS M. -
Arch. Dis.Child. I932 7 I49
96. SURE B., KIK M.C., BUCHANAN K.S., THATCHER H.S. et de GROAT A.-Biochem. J. I935 29 I508
97. UZAWA S. -
J.Biochem.Japan I932 I5 I&II
98. WATKINSON J.M., DELORY G.E., KING E.J. et HADDOW A. -
Brit.Med.J. I944 2 492
99. WEIL L. -
J.biol.Chem. I94I I38 375
I00. WISLOCKI G.B., DEANE H.W. et DEMPSEY E.W. -
Amér. J. Anat. I946 78 28I
I0I. WOLBERGS H. -
Z. physiol.Chem. I936 238 23
I02. WOLFROM G. et LOYSELEUR J. -
Bull.Acad.Chirurg. I946 3 I96
I03. WOODARD H.Q. -
Cancer Research. 1942 2 497
I04. WU H. -
J.biol.Chem. I922 5I 33 & 39

:-:-:-:-:-:

Vu,

Le Président de Thèse:

P. FLEURY

Paris, le 26 Avril 1948

Vu,

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie:

R.FABRE

Vu
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

J. SARRAILH